

Aus dem
Institut für Veterinär-Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Auswirkung intrauteriner Plastikbälle („small uterine devices“)
auf die histomorphologischen und immunhistologischen Befunde
des equinen Endometriums**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Veronika Klein, geb. Walzl
aus Köln

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen
Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon
Institut für Veterinär-Pathologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

PD Dr. Claus Peter Bartmann
Einsatz- und Ausbildungszentrum für Gebirgstragtierwesen
Bad Reichenhall

Tag der Verteidigung: 20. Januar 2015

Das Glück der Erde,
liegt auf dem Rücken der Pferde.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Rosseunterdrückung bei Pferden	2
2.2 Sexualzyklus und Gravidität der Stute.....	3
2.2.1 Der Sexualzyklus der Stute.....	3
2.2.2 Die equine Gravidität	3
2.2.3 Endokrine Regulation des Sexualzyklus und der frühen Trächtigkeit	6
2.2.3.1 Luteolyse und maternale Trächtigkeitserkennung	7
2.2.4 Immunhistologische Untersuchungen des Endometriums im Zyklusverlauf und während der Gravidität	9
2.2.4.1 Östrogen- und Progesteronrezeptoren.....	9
2.2.4.2 Ki-67 Antigen	10
2.2.4.3 Cyclooxygenase 2	10
2.3 Sekretorische Aktivität des Uterus	11
2.3.1.1 Uterokalin	11
2.3.1.2 Uteroferrin	12
2.3.1.3 Uteroglobin	13
2.4 Pathologie des equinen Endometriums.....	14
2.4.1 Histopathologische Veränderungen	14
2.4.1.1 Endometrose	14
2.4.1.2 Endometritis.....	16
2.4.2 Zelluläre Infiltrationen	17
2.4.2.1 Neutrophile Granulozyten	17
2.4.2.2 Makrophagen	18
2.4.2.3 Lymphozyten und Plasmazellen	18
2.4.2.4 Mastzellen.....	19
2.4.2.5 Eosinophile Granulozyten	19
2.4.3 Endometriumbiopsie als diagnostisches Mittel	20
2.5 Rosseunterdrückung bei Pferden	22
2.5.1 Methoden zur Rosseunterdrückung.....	22

2.5.2	Intrauterine devices (IUDs)	23
2.5.2.1	Allgemeine Betrachtung	23
2.5.3	IUDs zur Rosseunterdrückung bei Pferden	24
2.6	Fazit aus der Literatur bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit.	30
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1	Tiergut, Material und Probenherkunft	31
3.2	Nähere Charakterisierung des Tiergutes	31
3.3	Methoden.....	32
3.3.1	Probenentnahme und Probenaufbereitung	32
3.3.2	Anfertigung und Färbung der Schnitte	34
3.3.3	Lichtmikroskopische Auswertung und Kategorisierung	34
3.4	Histologische Spezialfärbungen	36
3.4.1	Unna-Pappenheim-Färbung (Methylgrün-Pyronin-Färbung) zur Identifizierung von Plasmazellen.....	36
3.4.2	Panoptische Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald- Giemsa-Färbung) zur Identifizierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen	36
3.5	Immunhistologische Methoden	37
3.5.1	Immunhistologische Kontrollen.....	37
3.5.2	Auswertung der immunhistologischen Untersuchung	37
3.6	Statistische Untersuchung.....	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Anamnestische Untersuchungsbefunde	40
4.1.1	Zusammensetzung der Gruppen	40
4.1.2	Altersverteilung.....	41
4.2	Histopathologische Untersuchungsbefunde am Endometrium	41
4.2.1	Prävalenz der Endometritis im Untersuchungsgut	42
4.2.2	Prävalenz der Endometrose im Untersuchungsgut	43
4.2.3	Prävalenz der Angiosklerose im Untersuchungsgut	44
4.2.4	Kategorisierung	45
4.3	Immunhistologische Untersuchungen der Cyclooxygenase 2	46
4.3.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich	47
4.4	Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis der endometrial synthetisierten Proteine.....	48

4.4.1	Uteroferrin (UF)	48
4.4.1.1	Uteroferrin-Expression im luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge	49
4.4.1.2	Uteroferrin-Expression in den Drüsenzellen	49
4.4.1.3	Gesamtscore der Uteroferrin-Expression	50
4.4.1.4	Ergebnisse im Gruppenvergleich	51
4.4.1.5	Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose	53
4.4.2	Uterokalin (UK)	53
4.4.2.1	Uterokalin-Expression im luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge	53
4.4.2.2	Uterokalin-Expression in den Drüsenzellen	54
4.4.2.3	Gesamtscore der Uterokalin-Expression	55
4.4.2.4	Ergebnisse im Gruppenvergleich	55
4.4.2.5	Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose	56
4.4.3	Uteroglobulin (UG)	57
4.4.3.1	Uteroglobulin-Expression in den basalen Drüsenzellen (bDr)	58
4.4.3.2	Ergebnisse im Gruppenvergleich	59
4.4.3.3	Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose	60
4.4.4	Zusammenfassung Proteinexpression	61
4.5	Immunhistologische Ergebnisse zum Nachweis von Steroidhormonrezeptoren	62
4.5.1	Östrogenrezeptoren	62
4.5.1.1	Östrogenrezeptor-Expression im luminalen Epithel (LE) und den Ausführungsgängen (AS)	62
4.5.1.2	Östrogenrezeptor-Expression in den Drüsenzellen (DZ)	63
4.5.1.3	Östrogenrezeptor-Expression in den Stromazellen (SZ)	63
4.5.1.4	Ergebnisse im Gruppenvergleich	65
4.5.2	Progesteronrezeptoren	65
4.5.2.1	Progesteronrezeptor-Expression im luminalen Epithel (LE) und den Ausführungsgängen (AS)	66
4.5.2.2	Progesteronrezeptor-Expression in den Drüsenzellen (DZ)	66
4.5.2.3	Progesteronrezeptor-Expression in den Stromazellen (SZ)	66
4.5.2.4	Ergebnisse im Gruppenvergleich	67
4.6	Ki-67 Antigenexpression	67

4.7	Vergleichende histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Endometriums hinsichtlich des Auftretens von Entzündungszellen	68
4.7.1	T-Lymphozyten.....	68
4.7.1.2	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	69
4.7.2	B-Lymphozyten	70
4.7.2.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	71
4.7.3	Plasmazellen	72
4.7.3.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	73
4.7.4	Makrophagen	74
4.7.4.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	74
4.7.5	Neutrophile Granulozyten	76
4.7.5.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	77
4.7.6	Eosinophile Granulozyten	78
4.7.6.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	78
4.7.7	Mastzellen.....	79
4.7.7.1	Ergebnisse im Gruppenvergleich.....	80
4.7.8	Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich der Auszählung der Entzündungszellpopulationen.....	81
5	DISKUSSION	83
5.1	Ziel der Arbeit	83
5.2	Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden.....	83
5.3	Abschließende Betrachtung der Resultate	84
5.3.1	KB-Stuten	84
5.3.2	IUD-Stuten.....	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	SUMMARY	95
8	LITERATURVERZEICHNIS	97
9	ANHANG.....	122
9.1	Charakterisierung des Tiergutes	122
9.2	Immunhistologie	123
9.2.1	Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen	123
9.2.2	Besondere Verfahren	124

9.2.3	Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der Peroxidase-anti- Peroxidase-Methode (PAP)	124
9.2.4	Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der Peroxidase-anti- Peroxidase-Methode (PAP)	124
9.2.5	Standard zur Nachbehandlung	125
9.2.6	Verwendete Antikörper und Seren.....	126
9.2.7	Lösungen und Puffer	127
10	DANKSAGUNG.....	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
aDr	apikale Drüsen
AS	Ausführungsgänge
bDr	basale Drüsen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.l.	Corpus luteum
cm	Zentimeter
COX2	Cyclooxygenase2
d	Tag
EP 1-4	Prostaglandin-Rezeptor E 1-4
ER	Östrogenrezeptor
f	folgende [Seite]
ff	folgende [Seiten]
FR	Prostaglandin-Rezeptor F
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GE	glanduläres Epithel
ggr	geringgradig
h	Stunde
H.E.	Hämalaun-Eosin
hCG	humanes Choriongonadotropin
hgr	hochgradig
HPF	High Power Field
HPGD	Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase
i.m.	intramuskulär
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score
IUD	intrauterine device
KB	künstliche Besamung
LE	luminales Epithel
LH	luteinisierendes Hormon
mab	monoklonale Antikörper
mDr	mittlere Drüsen
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
mgr	mittelgradig

mm	Millimeter
MRP	maternal recognition of pregnancy
n	Probenanzahl
Nr.	Nummer
NSAID	non steroidal anti inflammatory drug
p.ov.	post ovulationem
pab	polyklonale Antikörper
PG	Prostaglandin
PGH2	Prostaglandin-H-Synthase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PR	Progesteronrezeptor
Prof.	Professor
PTGES	Prostaglandin E ₂ Synthase
PTGFS	Prostaglandin F _{2α} Synthase
RIA	Radioimmunassay
RM	resistant mares/resistente Stuten
rlP	reguläre luteale Phase
S.	Seite
SM	susceptible mares/empfindliche Stuten
Ssc	Secretionsscore
Tab.	Tabelle
TNF _α	Tumornekrose-Faktor α
UF	Uteroferrin
UG	Uteroglobin
UK	Uterokalin
US	Untersuchung
vgl.	vergleiche
vlP	verlängerte luteale Phase
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
%	Prozent
>	größer als, mehr als
<	kleiner als, weniger als
≥	größer gleich
≤	kleiner gleich

1 EINLEITUNG

Auf nationalen sowie internationalen Turnieren werden Pferde eingesetzt, um sportliche Erfolge zu erzielen und die Qualität der Tiere zu präsentieren. Insbesondere für Pferdezüchter ist es interessant, welche Leistungen Hengste und Stuten in ihrer Laufbahn erbracht haben, aber auch, ob die Qualitäten an die Nachkommen weitervererbt werden. In diesem Zusammenhang gewinnt auch die sportliche Leistung der Stuten immer mehr Bedeutung. Allerdings zeigen diese zyklusbedingte hormonelle Schwankungen, die ursächlich für Verhaltensänderungen in der Rosse sind und sowohl den Umgang mit dem Tier erschweren als auch die Rittigkeit einschränken (CROWELL-DAVIS 2007). Besitzer und Trainer äußern dementsprechend häufig den Wunsch nach einer Rosseunterdrückung. Diesbezüglich existieren für das Pferd verschiedene Methoden (VANDERWALL und NIE 2011), wobei die Gabe von Hormonen im Turniersport durch die Doping-Bestimmungen (ADMR 2013) der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN, Fédération Equestre Nationale) sowie der FEI (International Federation for Equestrian Sports) stark eingeschränkt ist.

Als Alternative, auch zu irreversiblen Eingriffen, wie zum Beispiel der Ovariectomie, die eine spätere Zuchtnutzung ausschließt (SCOTT und KUNZE 1977, HOOPER et al. 1993, KAMM und HENDRICKSON 2007), werden intrauterine Bälle (intrauterine devices: IUDs) eingesetzt, die zu einer Verlängerung der lutealen Phase führen. Diese stellen eine reversible, risikoarme und dopingfreie Methode dar, um die Rossessymptomatik zu unterdrücken. Der exakte Wirkmechanismus ist jedoch bis heute ungeklärt und die Effektivität bisher als gering einzustufen. Als mögliche Wirkmechanismen werden zwei Hypothesen in der Literatur diskutiert, dazu zählt eine Scheinträchtigkeit, ausgelöst durch die Nachahmung eines Embryos durch den Ball, und die Induktion einer chronischen Endometritis, verursacht durch die mechanische Irritation des Plastikballes. Desweiteren kann ein Placeboeffekt bei den Besitzern ohne eine unmittelbare Wirkung der IUDs nicht ausgeschlossen werden (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010).

Ziel der Studie ist eine histomorphologische und immunhistologische Untersuchung von equinen Endometriumbiopsaten nach Einsatz von IUDs und der Vergleich mit Biopsaten künstlich besamter Stuten (tragend/nicht tragend). Die Auswirkungen der intrauterinen Plastikbälle auf die Befunde des equinen Endometriums hinsichtlich pathohistomorphologischer Alterationen (Endometritis, Endometrose) und der Expression von Steroidhormonrezeptoren, endometrialen Proteinen, des Enzyms Cyclooxygenase 2 sowie die Infiltration mit Entzündungszellen (T-/B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen) werden untersucht und die möglichen Wirkmechanismen der IUDs diskutiert. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vergleich zwischen IUD-Stuten und künstlich besamten Tieren soll nach Möglichkeit einen Einblick in den bisher ungeklärten Wirkmechanismus der intrauterinen Bälle (small intrauterine devices: IUDs) geben.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Rosseunterdrückung bei Pferden

Die primäre Indikation für eine Rosseunterdrückung bei Stuten ist eine zyklusassoziierte Verhaltensänderung während des Östrus, die den Umgang mit dem Tier und somit die Teilnahme an Wettkämpfen erschwert. Sie äußert sich in Schweif schlagen, Urinieren, Widersetzlichkeit und Leistungsabfall (ASA et al. 1979, JORGENSEN et al. 1996, CROWELL-DAVIS 2007). Da ähnliche Verhaltensweisen auch zyklusunabhängig bei ovariectomierten und anöstrischen Stuten festgestellt werden können (ASA et al. 1980, KAMM und HENDRICKSON 2007), müssen Ursachen, wie z.B. Ungehorsam, Erkrankungen des Urogenitaltrakts oder Schmerzen im Bereich des Rückens differentialdiagnostisch zu zyklusbedingten Verhaltensänderungen in Betracht gezogen werden. Ebenso können Hormon-produzierende Ovarialtumore eine häufige Ursache für Verhaltensänderungen (z.B. Virilismus) bei der Stute darstellen (FRETZ 1977, ELLENBERGER et al. 2007). Auch Nebennierenhormone (Androgene) können, unabhängig von der ovariellen Aktivität, Rosse Symptome auslösen (WATSON und HINRICHS 1989, HEDBERG et al. 2007). Eine weitere Indikation zur Rosseunterdrückung ist die Zyklussynchronisierung bei Embryotransfer-Stuten (RAZ et al. 2011) mit dem Ziel, den Funktionszustand des Uterus der Empfänger-Stute dem der Spender-Stute anzugleichen, um für den Embryo ein optimales Milieu in der Gebärmutter des Empfängertieres bereit zu stellen.

Für das Pferd existieren zahlreiche Methoden zur Rosseunterdrückung (siehe Kap. 2.5.1, S. 21ff), welche unterschiedliche Wirkmechanismen und variable Effizienzen aufweisen. Ziel ist es, die zyklusbedingten hormonellen Schwankungen von Progesteron und Östrogen, die ursächlich für die Rosse Symptomatik und die damit verbundenen Verhaltensänderungen sind (NETT et al. 1976, GORECKA et al. 2005), zu unterbinden. Der manuelle Einsatz von intrauterinen Bällen ist eine reversible, risikoarme und dopingfreie Methode und stellt somit eine interessante Alternative zu irreversiblen Eingriffen, wie zum Beispiel der Ovariectomie, dar. Die Effektivität dieser Methode ist bisher als relativ niedrig einzustufen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der exakte Wirkmechanismus der intrauterinen Bälle bis heute noch ungeklärt ist und daher bisher keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden kann, ob der Einsatz lediglich bei bestimmten Stuten (z.B. bei speziellem Hormonstatus, Anzahl der Trächtigkeiten, endometriale Veränderungen) effektiv ist. In der Literatur (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010) werden zwei Hypothesen diskutiert: 1. eine Scheinträchtigkeit, ausgelöst durch die Nachahmung eines Embryos durch den Ball und 2. eine geringgradige chronische Endometritis, in Folge mechanischer Irritation durch den Plastikball. Ebenso kann ein Placeboeffekt bei den Besitzern, ohne eine unmittelbare Wirkung der IUDs, nicht ausgeschlossen werden. Zum besseren Verständnis der möglichen Wirkmechanismen wird im Folgenden zunächst auf den physiologischen Sexualzyklus und die Gravidität der Stute sowie auf die Pathologie des Endometriums eingegangen. Ein Schwerpunkt wird auf die entzündlichen Veränderungen im Endometrium mit Auswirkungen auf das Zyklusgeschehen gelegt.

2.2 Sexualzyklus und Gravidität der Stute

2.2.1 Der Sexualzyklus der Stute

Bedingt durch die Veränderung der Tageslichtlänge handelt es sich bei der Stute um ein saisonal polyöstrisches Tier. Die Zyklussaison dauert von Mai bis Oktober auf der Nordhalbkugel an und ist gefolgt von einer physiologischen Inaktivität des Endometriums in den Wintermonaten, dem sogenannten Winteranöstrus (ARTHUR 1958, WILLIAMS et al. 2012). Die Übergangsphasen (aus/in den Winteranöstrus) sind durch eine physiologische Asynchronizität hinsichtlich des klinischen Zyklusstands und der endometrialen Differenzierung gekennzeichnet (KENNEY 1978, SHARP 2011). Einen weiteren Einfluss auf das Zyklusgeschehen besitzen Faktoren wie z.B. Rasse, Alter, Fütterung, Stress und Körpergewicht (ADAMS und BOSU 1988, AURICH 2011). Die durchschnittliche Zykluslänge während der Decksaison beträgt 22 Tage (GINTHER et al. 1972, MCCUE et al. 2012). Sie wird funktionell und histomorphologisch in verschiedene Phasen eingeteilt. Die Proliferationsphase (8 Tage) beinhaltet den Präöstrus (3 Tage), den Östrus (2-3 Tage) und den Postöstrus. Die anschließende Sekretionsphase dauert 9 Tage (früher und mittlerer Interöstrus), gefolgt von einer viertägigen Involution (später Interöstrus) (BRUNCKHORST und SCHOON 1990, SCHOON et al. 1992). Die zyklusbedingt wechselnden histomorphologischen Charakteristika des Endometriums der Stute sind in Tabelle 2.1 (S. 4) zusammengefasst.

2.2.2 Die equine Gravidität

Die equine Gravidität dauert im Mittel 336 Tage (TRUM 1950, MOREL et al. 2002). Nach der Ovulation erfolgt die Befruchtung der Eizelle im Eileiter (BEZARD et al. 1989, BATTUT et al. 1997). Dort durchläuft die befruchtete Eizelle alle Furchungsstadien und setzt Prostaglandin (PG) E_2 für den Transport durch die Tuba uterina frei. PGE_2 führt dabei zu einer Relaxation der Muskulatur im Eileiter (WEBEL et al. 1977, WEBER et al. 1991, ALLEN et al. 2006). Nach 6 Tagen (vgl. Abb 2.1, S. 5) tritt das befruchtete Ei in den Uterus ein (FLOOD et al. 1979, BETTERIDGE et al. 1982, FREEMAN et al. 1991), während eine unbefruchtete Eizelle bereits im Eileiter degeneriert (BETTERIDGE und MITCHELL 1974, FLOOD et al. 1979). Im Uterus schließt sich eine lange Präimplantationsphase (6. bis 36. Tag) an (ALLEN et al. 1973), dabei ist die Blastozyste bis zum 22. Tag vollständig von einer azellulären Glykoproteinkapsel umhüllt (vgl. Abb 2.1, S. 5) und besitzt eine kugelförmige Gestalt (BETTERIDGE et al. 1982, ORIOL et al. 1993, KLEIN und TROEDSSON 2012). Von Tag 6 bis 17 setzt der Embryo die Prostaglandine PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ frei, welche starke Kontraktionswellen des Myometriums auslösen (WATSON und SERTICH 1989, WEBER et al. 1992, STOUT und ALLEN 2002). Somit wird der Konzeptus kontinuierlich durch den gesamten Uterus bewegt, wodurch das embryonale Signal zur maternalen Trächtigkeitserkennung (MPR: Maternal Recognition of Pregnancy; SHORT 1969, vgl. Abb 2.1, S. 5) im Uterus verteilt wird (GINTHER 1983, GRIFFIN und GINTHER 1993, STOUT und ALLEN 2001).

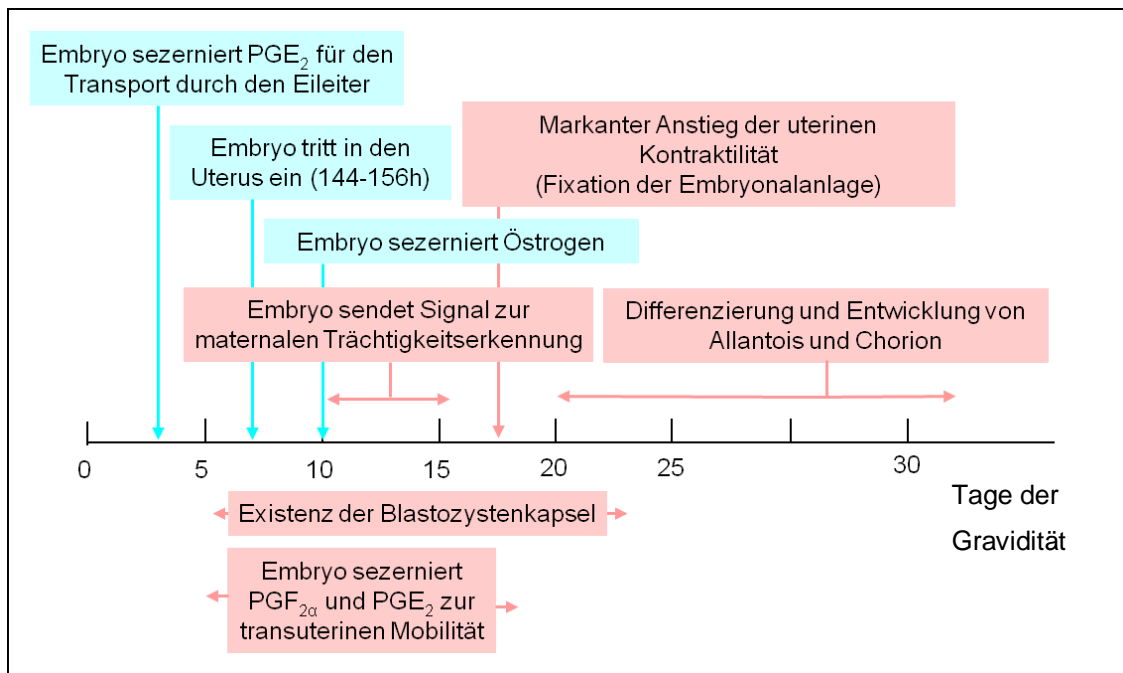
2 LITERATURÜBERSICHT

Tab. 2.1: Auswahl wichtiger histomorphologisch erfassbarer Charakteristika des zyklisch aktiven Endometriums der Stute

Endometrium Stute		Proliferationsphase			Sekretionsphase	Involutionsphase
		Präöstrus	Östrus	Postöstrus	früher/mittlerer Interöstrus	später Interöstrus
Oberflächenepithel		iso- bis hochprisma- tisch ^{1,2,3,5,6,12,14}	hochprismatisch ^{2,3,5,11,12}	hochprisma- tisch ^{3,11,13}	anfangs hoch- ⁵ , später isoprismatisch ^{2,6,7,11,12,13,14}	überwiegend flach ^{2,3,12} bis isoprismatisch ^{8,13}
Drüsen	Epithelzellen	iso- ⁵ bis hochprismatisch ⁴ ; kleine rundliche chromatinreiche Zell- kerne ^{5,8,13}	hochprismatisch ^{1,5,8,9,10} ; ovale bis rundovale, hy- perchromatische Zellker- ne ^{3,9,13}	ähnliche Befunde wie im Östrus, jedoch mit intensiverer Aus- prägung, Drüsen- extension erreicht ihren Höhepunkt ^{3,4,12,14}	verminderte Höhe ^{3,9,14} ; basale, rundliche, mäßig chromatinhaltige Kerne ^{3,5,12} ; api- kal Sekretvakuolen und Sekretfäden ^{3,4,5,9,13}	geringe Höhe ^{1,3,10,14} ; basal liegende kleine, rundli- che, hyperchromatische Zell- kerne ^{3,5,12,13}
	Drüsen- morphologie	beginnende Streckung ^{2,3,4} ; meist enge Lumina ohne Sekret ⁴	gestreckt ^{1,2,3,4,5,12,14} ; er- höhte Drüsenzahl ^{1,4} und Durchmesser ^{1,4,8,11} ; z. T. sekretgefüllte Lumi- na ¹¹		zunehmende „Schlängelung“ ^{1,5,6,7,11,13,14} ; hohe Drüsendichte ^{1,3,5,6,13,14} ; weite ⁷ , sekretgefüllte Lumina ¹³	beginnende Abnahme der „Schlängelung“ ^{5,13} ; geringerer Drüsendurchmes- ser ^{1,5} ; nur geringgradig dila- tierte Lumina ¹³
	Stroma	Stromazellen	kleine bis große ¹³ spin- delförmige ⁵ Kerne		undifferenzierte ⁵ Zellen, große ^{3,12} Zellkerne	maximale Größe des Zellkerns ^{3,5,12}
	Ödem	ungleichmäßig ^{5,6}	ausgeprägt ^{1,2,4,5,8,13}		Rückgang ^{3,4,6,13,14}	abnehmend ⁶ / fehlend ¹
Literatur zu Tab. 2.1: ¹ BRANDT 1970, ² BRUNCKHORST und SCHOON 1990, ³ BRUNCKHORST et al. 1991, ⁴ GORDON und SARTIN 1978, ⁵ HÄFNER 1999, ⁶ KENNEY 1978, ⁷ KENNEY und DOIG 1986, ⁸ KNUDSEN und VELLE 1961, ⁹ RAILA et al. 1997, ¹⁰ RICKETTS 1989, ¹¹ ROSSDALE und RICKETTS 1980, ¹² SCHOON et al. 1992, ¹³ STRANKMEYER 1993, ¹⁴ VAN CAMP 1988, ¹⁵ VOGEL und HUMKE 1973						

Die Mobilität ist demzufolge für eine erfolgreiche Trächtigkeit erforderlich (MCDOWELL et al. 1988). Das exakte embryonale Signal zur maternale Trächtigkeitserkennung ist allerdings bei Equiden bis heute unbekannt, es hemmt jedoch ein Enzym der Prostaglandinsynthese, die Cyclooxygenase 2 (WATSON und SERTICH 1989, BOERBOOM et al. 2004) und somit die endometriale luteolytische $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion, wodurch die Regression des Corpus luteum (C.l.) verhindert wird. Das C.l. cyclicum wird zum Corpus luteum graviditatis.

Abb. 2.1: Bedeutsame Vorgänge in der Etablierung der Frühgravidität der Stute
(modifiziert nach ALLEN 2001, DIETZ und HUSKAMP 2005)



An Tag 17 der Trächtigkeit erfolgt eine Fixation des Konzeptus in einem der beiden Uterushörner durch einen erhöhten myometrialen Tonus (GINTHER 1983, GRIFFIN und GINTHER 1990, STOUT und ALLEN 2001), ohne dass sich eine feste Verbindung zwischen Embryo und Uterus ausbildet (vgl. Abb 2.1). Da die endgültige Implantation (36. Tag) und die Ausbildung einer Plazenta jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, ist der Embryo zunächst auf die Histiotrophe („Uterinmilch“) angewiesen. Diese wird überwiegend von den endometrialen Drüsen sezerniert (AMOROSO 1952, ELLENBERGER et al. 2008). Im weiteren Verlauf bildet sich der Dottersackkreislauf aus, der ein Charakteristikum bei Stuten darstellt. Diese Dottersackplazenta (Omphalo-Plazenta) trägt neben der Histiotrophe wesentlich zur Ernährung des Embryos bei (AMOROSO 1952, RÜSSE und SINOWATZ 1991, GINTHER 1992). Ab dem 25. Tag der Trächtigkeit proliferieren und hypertrophieren die Trophoblastenzellen (embryonale Zellen) und bilden so den Choriongürtel (vgl. Abb 2.1). Sie wandern ab dem 36. Tag aktiv in das maternale Gewebe ein, wobei Schleimhautkrater entstehen, die sogenannten „endometrial cups“. Diese bleiben bis zum 100. Tag der Trächtigkeit bestehen und produzieren eCG, das equine Choriongonadotropin (ALLEN und MOOR 1972, ALLEN et al. 1973, VAGNONI et al. 1995, WOODING et al. 2001). Das eCG ist als luteinisierender Faktor (LH-Wirkung) an der Bildung der akzessorischen Corpora lutea im

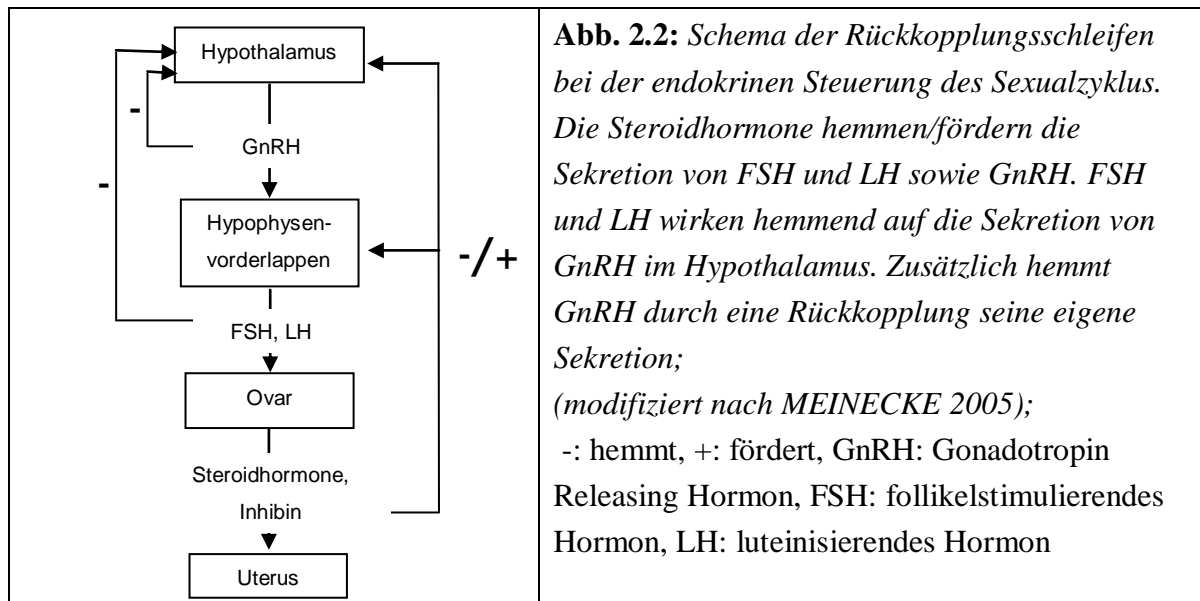
Ovar beteiligt, welche wiederum das trächtigkeitserhaltene Hormon Progesteron bilden (SQUIRES et al. 1974, BOETA und ZARCO 2012). Zusätzlich entwickeln sich am Tag 55 großflächig nicht-invasive Mikroplozentome im Bereich des Allantochorions (SAMUEL et al. 1974, ABD-ELNAEIM et al. 2006) und bilden die Placenta diffusa completa (STRAHL 1906). Anschließend entwickelt sich eine nicht-invasive Placenta epitheliochorialis (GROSSER 1909). Der nicht-invasive Charakter der Plazenta bedingt eine kontinuierliche endometriale Sekretion zur Ernährung des Konzepts ab dem 4. Graviditätsmonat bis zur Geburt (ELLENBERGER et al. 2008).

2.2.3 Endokrine Regulation des Sexualzyklus und der frühen Trächtigkeit

Im Verlauf eines Sexualzyklus wird zwischen einer Follikelphase (Östrus/Rosse) und einer lutealen Phase (Interöstrus) unterschieden, wobei der Wechsel zwischen den Phasen hormonell gesteuert wird. Diese endokrine Regulation des Sexualzyklus erfolgt über die in Abb. 2.2 (S. 7) dargestellte Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse (ADAMS und BOSU 1988, GINTHER 1992, AURICH 2011). Dabei wird aus dem **Hypothalamus** das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) pulsatil in das Portalgefäßsystem der Hypophyse freigesetzt (DEES et al. 1981, MELROSE et al. 1994). Diese Freisetzung wird durch exogene (Klima, Belastung) und endogene Faktoren (Opioide, Noradrenalin) beeinflusst (BEHRENS et al. 1993). Die pulsatile Freisetzung (Frequenz und Amplitude) des GnRH variiert jahreszeitlich- und zyklusbedingt, eine Steigerung erfolgt im Frühjahr zu Beginn der Decksaison und während des Zyklus im Östrus (HART et al. 1984, ALEXANDER und IRVINE 2011b).

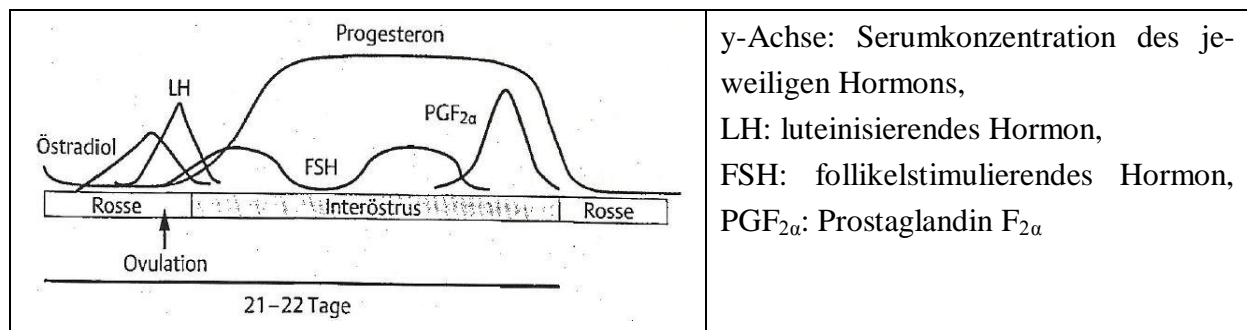
Aktiviert durch GnRH sezerniert die **Adenohypophyse** das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH) pulsatil in die periphere Blutbahn (BRASELTON, JR. und MCSHAN 1970). Diese Gonadotropine binden an ihre zellmembranständigen Rezeptoren, die sich an den Granulosazellen und Theka-interna-Zellen im **Ovar** befinden. Eine bedeutende Steuerung der Hormonfreisetzung erfolgt über Rückkopplungsschleifen („negatives/positives Feedback“; vgl. Abb. 2.2, S. 7).

Die **FSH**-Ausschüttung ist im Zyklus durch einen biphasischen Verlauf gekennzeichnet (vgl. Abb 2.3, S. 7) mit Höchstwerten kurz nach der Ovulation und während der lutealen Phase (EVANS und IRVINE 1975). Das Hormon fördert das Follikelwachstum im Ovar, schließlich formt sich ein dominanter Follikel (Graaf'scher Follikel), der die Entwicklung der Begleitfollikel durch eine Sekretion von Inhibin verhindert. Inhibin hemmt dabei die FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse (vgl. Abb. 2.2, S. 7), dies führt zu einer Atresie der nichtdominanten Follikel (BERGFELT und GINTHER 1985, ELLENBERGER 2003). Die Zellen des dominanten Follikels synthetisieren Androgene (Thekazellen), welche in den Granulosazellen durch das aktivierte Enzym Aromatase-17 β (FSH-Wirkung) zu Östradiol-17 β aromatisiert werden. Diese Östrogendominanz (Östrogen > Progesteron) der Follikelphase verursacht die inneren (Proliferationsphase des Endometriums; BRUNCKHORST et al. 1991) und äußeren (Verhaltensänderungen) Rossesymptome (NETT et al. 1976, GORECKA et al. 2005).



Stuten zeigen eine hohe **LH**-Ausschüttung über sieben Tage (vgl. Abb. 2.3), dabei steigt der Wert während der Rosse, erreicht Maximalwerte zum Zeitpunkt der Ovulation und sinkt danach über einige Tage langsam wieder ab (ADAMS und BOSU 1988, GINTHER 1992, ALEXANDER und IRVINE 2011a). LH bewirkt eine Follikelreifung, löst die Ovulation aus und wandelt die Theka interna- sowie die Granulosazellen in Luteinzellen um (Gelbkörperbildung), welche Progesteron bilden. Die Hormonfreisetzung des entstandenen C.I. ist ursächlich für die Progesterondominanz im Interöstrus (STABENFELDT et al. 1972). Progesteron, das graviditätssichernde Steroidhormon, verschließt die Zervix, verhindert Kontraktionen des Myometriums und stimuliert die Sekretionsphase im Endometrium, um geeignete Bedingungen für einen Embryo zu schaffen (VANDERWALL 2011). Außerdem wirkt ein hoher Progesteronspiegel im Diöstrus hemmend auf die immunologische Abwehr des Endometriums (EVANS et al. 1986, WATSON et al. 1987a, KATILA 1996).

Abb. 2.3: Konzentrationsverläufe der wichtigsten an der Steuerung des Sexualzyklus beteiligten Hormone (modifiziert nach AURICH 2009)



2.2.3.1 Luteolyse und maternale Trächtigkeitserkennung

Bei ausbleibender Konzeption wird im Hypothalamus Oxytocin gebildet. Dieses gelangt über einen axonalen Transport zur Hypophyse, wird anschließend in das Blut abgegeben und erreicht so seine Rezeptoren im Endometrium (GINTHER 1992). Oxytocin ist der auslösende

Stimulus für die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung, das ab dem 14. Tag des Zyklus in den Epithelzellen des Endometriums gebildet wird. Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion erfolgt dabei pulsatil, wobei die Stimulation durch Oxytocin maximal zum Zeitpunkt der Luteolyse ist (GOFF et al. 1987, STARBUCK et al. 1998). Die Stute bildet, neben der Oxytocin-Produktion im Hypothalamus, zusätzlich Oxytocin im Endometrium, aus diesem Grund wird eine parakrine-autokrine Beteiligung von Oxytocin an der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung vermutet (BAE und WATSON 2003).

Während bei Wiederkäuern und Schweinen $\text{PGF}_{2\alpha}$ unter Umgehung des großen Kreislaufes über utero-ovarielle Gefäße zum Ovar gelangt (GINTHER 1974), zirkuliert $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei der Stute im gesamten Kreislauf (STOUT 2011). Es bindet an die entsprechenden Rezeptoren der Luteinzellen und führt zur Regression des Gelbkörpers (Luteolyse). Die Progesteronkonzentration fällt somit innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Luteolyse des Corpus luteum ab (ADAMS und BOSU 1988, GINTHER 1992, AURICH 2011). Die exakte Interaktion zwischen Oxytocin, Progesteron und $\text{PGF}_{2\alpha}$ ist bis heute jedoch nicht vollständig geklärt. Das Corpus luteum spricht erst nach seiner Ausreifung auf $\text{PGF}_{2\alpha}$ an, zuvor wird keine Luteolyse ausgelöst (ALLEN und ROWSON 1973). Durch diöstrische Ovulationen entstehen daher persistierende Gelbkörper (AURICH 2009), da die Ausreifung der später entstandenen Gelbkörper zur Zeit der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung noch nicht abgeschlossen ist. Da eine Regression der verzögert gebildeten Gelbkörper unterbleibt, wird der Zyklus verlängert.

Für die Erhaltung einer Gravidität sendet der Embryo zur maternalen Trächtigkeitserkennung (MRP: maternal Recognition of Pregnancy; SHORT 1969) ein „Signal“ aus, wodurch sich aus dem Corpus luteum cyclicum ein Corpus luteum graviditatis bildet (ALLEN 2001, SPENCER et al. 2004). Bei *Rindern und Schafen* handelt es sich bei diesem Signal um das durch den Embryo synthetisierte „Interferon tau“. Dieses Protein hemmt die zyklische Zunahme von Oxytocinrezeptoren im Endometrium. In der Folge vermindert sich die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion und die Luteolyse wird unterbunden (GODKIN et al. 1982, LAMMING et al. 1995). Bei *Schweinen* erfolgt durch eine embryonale Östrogensekretion ab dem 10. bis 12. Tag der Trächtigkeit eine Umlenkung des endometrialen Prostaglandins, wodurch dieses nicht endokrin in die Uterusvene, sondern in das Uteruslumen sezerniert wird. $\text{PGF}_{2\alpha}$ erreicht den Gelbkörper nicht und die Luteolyse unterbleibt (BAZER und THATCHER 1977, GROSS et al. 1990, SPENCER et al. 2004). Das Signal zur maternalen Trächtigkeitserkennung ist bei *Equiden* bis heute unbekannt (ALLEN 2001). Es gilt jedoch als sicher, dass der Embryo die Prostaglandinsynthese blockiert, indem er das Enzym COX2 hemmt (BOERBOOM et al. 2004), das auslösende Signal ist allerdings unklar. Der equine Embryo sezerniert, wie bei Schweinen, Östrogen ab Tag zehn der Gravidität (ZAVY et al. 1979a, WALTERS et al. 2001, RAESIDE et al. 2012), allerdings ist dieses Hormon bei Stuten nicht das Signal zur MRP. Im equinen Endometrium ist die Anzahl der Oxytocinrezeptoren und die Affinität zu den Rezeptoren Oxytocin, ähnlich wie bei Rindern, während der maternalen Trächtigkeitserkennung im Vergleich zum Zeitpunkt der Luteolyse vermindert (SHARP et al. 1997, STARBUCK et al. 1998), so könnte die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion herabgesetzt und Luteolyse verhindert werden. Einige Autoren

vermuten, dass die mechanische Stimulation durch den Embryo das Signal zur MRP darstellt (RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, MERKL et al. 2010).

2.2.4 Immunhistologische Untersuchungen des Endometriums im Zyklusverlauf und während der Gravidität

2.2.4.1 Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Die Expression der Steroidhormonrezeptoren kann mittels immunhistologischer Methoden dargestellt werden, dabei wird die Konzentration der Rezeptoren mit Hilfe des immunreaktiven Scores (IRS) erfasst, der die Anzahl positiver Zellen und deren Färbeintensität berücksichtigt (BRUNCKHORST et al. 1991, ÖZGEN 1999, AUPPERLE et al. 2000).

Im Uterus der Stute sind die intranukleären Rezeptoren während des Zyklus in den Drüsenepithelien und in den Stromazellen nachweisbar. Die Expression der Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) zeigt eine enge Korrelation zu den peripheren Hormonkonzentrationen im Blut (AUPPERLE et al. 2000), dabei weisen die Stromazellen und die Epithelien ein unterschiedliches Reaktionsmuster auf. Im glandulären Epithel steigt die Expression der ER- und PR-Rezeptoren im Östrus und im Postöstrus an und erreicht die höchsten Werte im frühen Interöstrus (Proliferationsphase). Dagegen tritt bei den Stromazellen die maximale ER-Expression zum Zeitpunkt der Ovulation auf. Die PR-Expression in den Stromazellen erreicht ihr Maximum im späten Diöstrus (ÖZGEN 1999, AUPPERLE et al. 2000, RAILA 2000). Eine verminderte ER- und PR-Expression wird in der folgenden Sekretionsphase mit steigenden Progesteronwerten beobachtet (TOMANELLI et al. 1991, RAILA et al. 1997, MCDOWELL et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, HARTT et al. 2005).

In der frühen Gravidität (Tag 14) und im späten Interöstrus (Tag 14) ist eine vergleichbare Steroidhormonrezeptorexpression im Endometrium nachweisbar (WATSON et al. 1992), allerdings zeigt sich eine Abnahme der Rezeptoren bei fortschreitender Trächtigkeit mit anhaltend hohen Progesteronwerten im Vergleich zum zyklischen Endometrium. Im Interöstrus und der frühen Trächtigkeit ist, wie auch bei anderen Säugetieren (Wiederkäuer) beschrieben (BAZER et al. 2009), keine PR-Expression im LE nachweisbar. Dabei wird vermutet, dass es einer Down-Regulation der Rezeptoren im LE für die Implantation bedarf (TOMANELLI et al. 1991, MCDOWELL et al. 1999, HARTT et al. 2005, WILSHER et al. 2011).

Weitere Faktoren, wie zum Beispiel eine Endometritis oder ein Corpus luteum persistens, beeinflussen die Konzentration der Steroidhormonrezeptoren im equinen Endometrium. Dabei wirkt Progesteron hemmend auf die Expression der Rezeptoren, dagegen stimuliert Östrogen die Expression (AUPPERLE et al. 2000). Daher zeigen Stuten mit einer verlängerten Lutealphase (Progesterondominanz) einen geringen Nachweis an ER- und PR-Rezeptoren (TOMANELLI et al. 1991). Zudem verändert das Vorliegen einer Endometritis sowie Manipulationen am Uterus die Rezeptorexpression im Endometrium (TOMANELLI et al. 1991, WATSON et al. 1992, ÖZGEN et al. 2002, KALPOKAS et al. 2010), da bei diesen Prozessen der Progesteronspiegel vermindert wird (TROEDSSON et al. 2001).

2.2.4.2 Ki-67 Antigen

Der nukleäre Proliferationsmarker Ki-67 Antigen wird von Zellen in der aktiven Phase des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phase) exprimiert (GERDES et al. 1983, SCHLUTER et al. 1993, ENDL und GERDES 2000). Es handelt sich um ein Immunglobulin der Klasse G_1 (BROWN und GATTER 1990, SCOTT et al. 1991, SAWHNEY und HALL 1992), dessen Expression durch die schnelle Katabolisierung zeitgleich mit dem Zellzyklus verändert wird (BRUNO und DARZYNKIEWICZ 1992, MCCORMICK et al. 1993). Zudem wird das Ki-67 Antigen als Marker für die Regeneration von Geweben verwendet, so zum Beispiel im Endometrium der Stute während Entzündungen (WITTE et al. 2012) oder der uterinen Involution nach der Geburt (JISCHA et al. 2008).

Im equinen Endometrium wird das Ki-67 Antigen im luminalen Epithel, dem glandulären Epithel und den Stromazellen exprimiert und zeigt einen typischen Zyklusverlauf (AUPPERLE et al. 2000). Die zyklusassoziierte endometriale Proliferation kann in eine stromale und eine epitheliale Proliferation unterteilt werden (AUPPERLE et al. 2000). In der Follikelphase (Östrogendominanz) erreicht die Ki-67-Expression in den Stromazellen ein Maximum (stromale Proliferation). Die epitheliale Proliferation (LE, GE) dagegen weist die höchsten Werte im frühen Interöstrus auf. In der späten lutealen Phase (Progesterondominanz) ist die Proliferationsaktivität maximal geringgradig ausgeprägt (GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, ÖZGEN et al. 2002). Während der frühen Trächtigkeit (14. Tag) weisen GERSTENBERG et al. (1999) keine Proliferationsaktivität nach. SILVA et al. (2011) dagegen registrieren an Tag 14 der Gravidität vereinzelt Ki-67 Antigen-exprimierende Zellen.

2.2.4.3 Cyclooxygenase 2

Die Cyclooxygenase 2 (COX2), auch Prostaglandin-H-Synthase 2 (PGH2) genannt, ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese. COX2 ist ein in fast allen Zellen lokalisiertes, induzierbares Transmembranenzym, zu dessen Stimuli pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF_α (JONES et al. 1993), Wachstumsfaktoren, Hormone wie LH (SIROIS et al. 1992) und mechanische Traumata (SMITH et al. 1996) zählen. Eine Hemmung des Enzyms erfolgt durch Glukokortikoide und anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-13) sowie medikamentell durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID). Das Einwirken einer Noxe setzt zunächst aus der Zellmembran die Arachidonsäure (AA) durch die Ca^{2+} -abhängige Phospholipase (PL) A_2 frei. COX2 katalysiert anschließend die Umwandlung der AA zu Prostaglandin (PG) H_2 . Aus PGH_2 können in zahlreichen Geweben durch verschiedene PG-Synthasen (PTGES, PTGFS) Prostaglandine, wie zum Beispiel PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$, gebildet werden. Diese binden an spezifische Rezeptoren (EP 1-4, FR), werden über entsprechende Transporter aus der Zelle geschleust (BANU et al. 2008) und weisen parakrin/autokrin vielfältigste, teils gegensätzliche oder synergistische Wirkungen auf (SUGIMOTO und NARUMIYA 2007). So spielt z.B. das Verhältnis von PGE_2 zu $PGF_{2\alpha}$ eine wichtige Rolle während der Luteolyse und durch die Carbonyl-Reduktase 1 (CBR1) ist eine Konvertierung zwischen den beiden PG ist möglich. PG ist zum einen bei kontinuierlicher Freisetzung an der Entstehung entzündlicher Reaktionen beteiligt, zum anderen besitzt es bedeutsame Funktio-

nen während des Sexualzyklus und der Gravidität (KLEIN und TROEDSSON 2011). PGE_2 wirkt uterusrelaxierend und luteotrop, während $\text{PGF}_{2\alpha}$ als ein Gegenspieler zu Uteruskontraktionen und, pulsatil ausgeschüttet, zur Luteolyse führt (GOFF et al. 1984). Der Abbau von PG erfolgt durch die Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (MCCRACKEN et al. 1999, FUNK 2001, HELLIWELL et al. 2004).

COX2 wird im Endometrium der Stute als Marker für entzündliche Prozesse genutzt (KOBLSCHKE et al. 2008, PALM et al. 2008, WITTE et al. 2012), zeigt aber auch zyklusassoziierte Veränderungen in der Expression (BOERBOOM et al. 2004). Im Interöstrus wird eine intensive Expression zur Zeit der Luteolyse beobachtet, welche anschließend zwischen Tag 15 und 22 wieder absinkt. Dagegen blockiert die Anwesenheit des Embryos die COX2-Expression (BOERBOOM et al. 2004, ATLI et al. 2010, EALY et al. 2010). Es besteht eine enge Korrelation zwischen der COX2-Expression und der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion (BOERBOOM et al. 2004). Durch die embryonale COX2-Hemmung ist die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung vermindert, so dass der Gelbkörper bestehen bleibt und das Trächtigkeitserhaltende Hormon Progesteron weiterhin sezerniert wird. Weitere Enzyme, Produkte und Rezeptoren der Prostaglandin-Biosynthese sind im equinen Endometrium untersucht worden (SUGIMOTO und NARUMIYA 2007). Zum Beispiel zeigt die PLA_2 einen Anstieg in der Expression während der Luteolyse und geringere Werte bei hohen Progesteronkonzentrationen in der Gravidität (ABABNEH et al. 2011). Der Nachweis des $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Rezeptors (FR) ist während der frühen Trächtigkeit im Vergleich zu der Rezeptor-Expression in zyklischen Stuten vermindert (VILLANI et al. 2008, ATLI et al. 2010). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Regulation der Prostaglandin-Biosynthese eine bedeutende Funktion bei der Etablierung der Gravidität besitzt und zudem wichtige Funktionen in der uterinen Abwehr wahrnimmt.

2.3 Sekretorische Aktivität des Uterus

Da das Pferd während der Gravidität im Vergleich zu anderen Spezies eine sehr lange Präimplantationsphase aufweist (vgl. Kap. 2.2.2, S. 3), ist der Embryo bei dieser Tierart auf die Histiotrophe („Uterinmilch“; AMOROSO 1952) angewiesen (STEWART et al. 1995, BEIER-HELLWIG et al. 1995). Dieses Produkt aus glandulärer Sekretion und Serumproteinen (Transudat) ist für die Entwicklung und Ernährung des Konzeptus essentiell (ROBERTS und BAZER 1988) und gelangt hormonabhängig (Progesteron/Östrogen) in unterschiedlicher Konzentration in das Uteruslumen (BEIER 1974). Proteine sind dabei die quantitativ dominierende Fraktion im Uterussektret (ZAVY et al. 1982, BEIER-HELLWIG et al. 1995), dazu zählen Uteroglobulin, Uteroferrin und Uterokalin, die mittels Immunhistologie intrazytoplasmatisch in dem luminalen und glandulären Epithel nachgewiesen werden können (ELLENBERGER et al. 2008, HOFFMANN et al. 2009a).

2.3.1.1 Uterokalin

Uterokalin (UK) dient als Transportprotein zwischen der Stute und dem Konzeptus und ist Bestandteil der embryonalen Kapsel. Das synonym als U1 (ZAVY et al. 1982, HINRICHS et al. 1989), P18 (STEWART et al. 1995) und P19 (CROSSETT et al. 1996) bezeichnete UK

gehört zu der Familie der Lipokaline und kann ein Molekulargewicht zwischen 18 und 22 kDa erreichen. Es ist nicht glykosyliert (STEWART et al. 1995) und weist für die Familie der Lipokaline eine ungewöhnliche, exponierte Tryptophan-Seitenkette auf (SUIRE et al. 2001). Diese ist wahrscheinlich für die Aufnahme von UK durch den equinen Trophoblasten zuständig. UK ist imstande, zahlreiche Liganden, wie Fettsäuren, andere kleine Lipide und Retinol zu binden, die ohne ein solches Transportprotein aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften aggregieren würden (HERRLER et al. 2000, SUIRE et al. 2001). Das Protein selbst besteht teils aus essentiellen Aminosäuren (KENNEDY 2005). Die Autoren (SUIRE et al. 2001, KENNEDY 2005) schlussfolgern, dass UK nicht nur als Transportprotein fungiert, sondern zusätzlich auch als Proteinquelle für den Embryo dient. Das vom Endometrium synthetisierte, progesteronabhängige Protein ist eine der Hauptkomponenten des equinen Uterussekretes. Es wird während der lutealen Phase (10.-14. Tag p.ov.), der Frühgravidität (Maximum 16. Tag) und in der Zeit der Ausbildung der „endometrial cups“ in großen Mengen sezerniert, dabei weist UK eine enge Korrelation zu den Serumprogesteronkonzentrationen auf (STEWART et al. 1995, STEWART et al. 2000b, ELLENBERGER et al. 2008, HOFFMANN et al. 2009a). Während der Trächtigkeit ist das Protein zusätzlich in der azellulären Glykoproteinkapsel, den Trophoblastenzellen und in der Dottersackflüssigkeit des Embryos zu finden (CROSSETT et al. 1998, HAYES et al. 2008, SMITS et al. 2012).

2.3.1.2 Uteroferrin

Uteroferrin (UF), eine sezernierte Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP, *tartrate-resistant acid phosphatase*; KETCHAM et al. 1985, LING und ROBERTS 1993b), ist ein basisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und einem Kohlehydratanteil von 4,8 %. Durch eine Mutation der Oligosaccharidseitenkette mit hohem Mannoseanteil wird es, im Gegensatz zu der lysosomalen TRAP, von Makrophagen und endometrialen Drüsenzellen (MURRAY, JR. et al. 1972, SAUNDERS et al. 1985, PADUA et al. 2012) sezerniert (BAUMBACH et al. 1984, LING und ROBERTS 1993a, LING und ROBERTS 1993b). Das Protein weist zwei gebundene Eisenatome (Metalloenzym) auf. Durch die Reduktion eines Eisenatoms erhält UF eine saure Phosphatase-Aktivität und katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern unter sauren Bedingungen (SCHLOSNAAGLE et al. 1974, MCDOWELL et al. 1982). Zudem ist UF in der Lage, eine Lipidperoxidation zu induzieren (VALLET et al. 1996) und bildet mit Glykoproteinen ein Heterodimer, dessen Funktion unbekannt ist (BAUMBACH et al. 1986, MURRAY et al. 1989). Weiterhin kann UF reaktive Sauerstoffspezies generieren (ODDIE et al. 2000, HALLEEN et al. 2003, RAISANEN et al. 2005) und besitzt somit eine wichtige Aufgabe in der Immunabwehr. So zeigen TRAP-knockout Mäuse eine abnorme Zytokinsekretion sowie eine verminderte bakterielle Bekämpfung (BUNE et al. 2001, HAYMAN und COX 2003). In der Humanmedizin wird UF/TRAP als Biomarker für chronische Entzündungen verwendet (JANCKILA und YAM 2009, JANCKILA et al. 2011). Auch bei der Stute kann vermehrt UF nachgewiesen werden bei Entzündungen, wie zum Beispiel nach der Abtreibung eines Embryos mit Cloprostenol (HAYES et al. 2012) sowie post partum (REILAS und KATILA 2002). Die Regulation erfolgt gewebe- und zellspezifisch

sowie hormonabhängig. Dabei fördert Progesteron und hemmt Östrogen die Expression (BASHA et al. 1980, MCDOWELL et al. 1987, SIMMEN et al. 1991). In geringen Mengen haben Östrogen und Prolaktin in Verbindung mit Progesteron eine synergistische Wirkung (FLISS et al. 1991). Weiter können verschiedene nukleäre Proteine an den Promotor des Acp 5 Gens (UF/TRAP) binden, dies zeigt die Komplexität der Regulation in den endometrialen Zellen (GONZALEZ et al. 1995). Im Endometrium der Stute ist UF durch ein zyklusassoziertes Expressionsverhalten gekennzeichnet, so kann mit dem Absinken der Progesteronwerte im Blut eine maximale Expression an Tag 12 bis 14 des Zyklus nachgewiesen werden (ZAVY et al. 1979b, MCDOWELL et al. 1982, HOFFMANN et al. 2009a). Anschließend erfolgt ein Abfall der UF-Expression (Tag 20), während gravide Stuten einen Anstieg im Verlauf der Trächtigkeit aufweisen (ZAVY et al. 1979a, MCDOWELL et al. 1990, ELLENBERGER et al. 2008). Während der Gravidität dient UF in der Histiotrophe als hämatopoetischer Wachstumsfaktor für den Konzeptus (BAZER et al. 1991, LAURENZ et al. 1997) und Carrierprotein für den maternal-fetalen Eisentransport (MCDOWELL et al. 1982, DUCSAY et al. 1986, WOODING et al. 2000).

2.3.1.3 Uteroglobulin

Uteroglobulin (UG), auch als Sekretoglobin 1a1 bezeichnet (NI et al. 2000, KLUG et al. 2000), ist ein 16 KDa schweres, aus zwei antiparallel angeordneten Aminosäureketten bestehendes und über zwei Disulfidbrücken verbundenes, sekretorisches Protein (MORNON et al. 1980, MORIZE et al. 1987). UG wurde erstmals im Uterussekret von graviden Kaninchen von BEIER (1968) und KRISHNAN und DANIEL, JR (1967) beschrieben und konnte nachfolgend bei vielen Tierarten (AUMÜLLER et al. 1985) und dem Menschen (DIERYNCK et al. 1995) nachgewiesen werden. Es wird von Schleimhautepithelzellen aller Organe, die mit der äußeren Umwelt kommunizieren (Respirations-, Gastrointestinal-, Urogenitaltrakt) exprimiert und ist in Blut, Seminalplasma und weiteren Körperflüssigkeiten detektierbar (NOSKE und FEIGELSON 1976, MUKHERJEE et al. 2007). UG besitzt eine anti-inflammatorische Wirkung und schützt den Organismus vor einer übermäßigen Aktivierung entzündlicher Prozesse infolge äußerer Umwelteinflüsse (AUMULLER et al. 1985, DIERYNCK et al. 1995, COTE et al. 2012). In diesem Zusammenhang hemmt UG die Phospholipase A₂, ein Enzym der Biosynthese von immunmodulatorischen Eicosanoiden wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen (LEVIN et al. 1986, KIKUKAWA et al. 1988, FACCHIANO et al. 1991). Dabei wirkt UG antichemotaktisch (VASANTHAKUMAR et al. 1988) und hemmt die Plättchenaggregation (MANJUNATH et al. 1987) sowie die Zytokinproduktion. UG besitzt hydrophobe Bindungsstellen und kann zum Beispiel PGF_{2α} binden. So wird die Konzentration des PGs im Uterus vermindert, wodurch dessen Wirkung (luteolytisch, pro-inflammatorisch) eliminiert wird (PATTABIRAMAN et al. 2000, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2002). Durch die Bindung von Fibronektin und die Hemmung der Migration von Fibroblasten wirkt UG weiterhin einer Fibrose entgegen (LESUR et al. 1995, FARROW et al. 2000), ferner ist es als Tumorsuppressor bekannt (LINNOILA et al. 2000, PERI et al. 2000, TANAKA et al. 2004). Eine Transglutaminase katalysiert die Bindung von UG an Oberflächeantigene des Embryos,

um den Konzeptus (Allograft) von der maternalen Immunabwehr abzuschirmen (MUKHERJEE et al. 1982, MANJUNATH et al. 1984). Ein vergleichbarer Mechanismus maskiert die Spermatozoen im Uterus (MUKHERJEE et al. 1983, EL ETREBY et al. 1983). Zudem wird vermutet, dass UG zur Ernährung des Embryos dient (KRISHNAN und DANIEL, JR. 1967, BEIER 1968, ELLENBERGER et al. 2008). Die Regulation der UG-Expression erfolgt gewebe- und zellspezifisch (SANDMOLLER et al. 1991, STOECKELHUBER et al. 2006, COTE et al. 2012) und im Uterus durch Steroidhormone. Dabei aktiviert Progesteron und hemmt Östrogen die UG-Expression (SHEN et al. 1983, HEGELE-HARTUNG und BEIER 1986, KRUSCHE 1999). Daneben wirken Östrogen in geringen Konzentrationen und Prolaktin synergistisch mit Progesteron stimulierend auf die UG-Expression (CHILTON und DANIEL, JR. 1987, RANDALL et al. 1991, HEWETSON und CHILTON 1997). Der Nachweis von UG im Endometrium der Stute gelingt im gesamten Zyklus vorwiegend in den basalen und mittleren Drüsen sowie vereinzelt im luminalen Epithel (HOFFMANN et al. 2009a). Mit sinkenden Serumprogesteronwerten tritt ein Maximum im Interöstrus auf, ähnlich der UF-Expression (BEIER-HELLWIG et al. 1995, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2001, HOFFMANN et al. 2009a). Während der Trächtigkeit erfolgt die UG-Expression konstant in geringen Mengen (ELLENBERGER et al. 2008, HAYES et al. 2012).

2.4 Pathologie des equinen Endometriums

2.4.1 Histopathologische Veränderungen

Im Endometrium der Stute können zahlreiche Alterationen auftreten. In Tabelle 2.2 (S. 15) werden häufige pathologische Befunde, die mittels Endometriumbiopsie diagnostizierbar sind, dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Endometritis und der Endometrose erfolgt in den Kapiteln 2.4.1.1 und 2.4.1.2 (S. 16), da diesen Veränderungen ein besonderer Stellenwert im Bezug auf die Fertilität der Stute zukommt.

2.4.1.1 Endometrose

Die Endometrose der Stute beschreibt eine periglanduläre und/oder stromale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Areale (SCHOON et al. 1997). Für diese Veränderung wurden zuvor verschiedene Bezeichnungen aufgeführt, z.B. chronische degenerative Endometritis (RICKETTS 1975). Der Begriff der Endometrose wurde von KENNEY (1992), zur Abgrenzung der degenerativen endometrialen Alterationen von den entzündlichen Veränderungen, als Sammelbegriff vorgeschlagen. Die Eingrenzung des Begriffs erfolgte durch SCHOON et al. (1997). Die Endometrose ist eine degenerative, irreversible, klinisch nicht diagnostizierbare Alteration des Endometriums und stellt eine der Hauptursachen equiner Fertilitätsstörungen dar (SCHOON et al. 1992, SCHOON et al. 1997). Die histopathologische Beurteilung berücksichtigt den Fibrosegrad, den Aktivitätszustand der periglandulären Stromazellen (aktiv, inaktiv, gemischt) und den gegebenenfalls destruierenden Charakter (vgl. Kap. 3.3.3, S. 34ff) der Veränderung sowie die Verteilung im Endometrium (RAILA 2000, HOFFMANN 2006). Durch diese Kriterien wird der Schweregrad der Endometrose ermittelt. Es können sowohl Einzeldrüsen als auch Drüsenkomplexe („Nester“)

betroffen sein (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1994b). Die Funktionsmorphologie der betroffenen glandulären Epithelien unterscheidet sich häufig von den unveränderten Drüsenzellen und wird als glanduläre zyklusasynchrone Differenzierung bezeichnet (SCHOON et al. 1997).

Tab. 2.2: Häufige pathologische Veränderungen im Uterus der Stute
(modifiziert nach STIEF 2004)

Alteration	Charakteristika
Endometritis	entzündliche Prozesse: in Qualität und Quantität über das physiologische Maß hinausgehende Infiltration von Entzündungszellen ^{7,11}
Endometrose	periglanduläre und/oder stromale Fibrose, einschließlich der dadurch bedingten glandulären Alterationen ¹⁴
endometriale Zysten	flüssigkeitsgefüllte Hohlräume (glanduläre Zysten, Phlebektasien, Lymphangiektasien, Lymphzysten) ^{6,8,12}
entzündliche Gefäßalterationen	- häufig: Perivaskulitis (lymphoplasmazelluläre Infiltration v.a. um venöse Gefäße / Kapillaren) ^{3,13} - selten: Vaskulitis ^{3,13}
Degenerative Gefäßalterationen	- Zubildung elastischer und/oder kollagener Fasern (Angiosklerose) ^{4,9,15} - Fragmentation und Duplikation der Membrana elastica interna ^{4,9,15}
Differenzierungsstörungen	- physiologische Asynchronizität während der Übergangszyklen ^{8,15} - endometriale Atrophie während der physiologischen Decksaison ⁸ - übermäßige Proliferation/Hypertrophie/-plasie der Drüsen ¹⁵ - sekretorische Hypertrophie, sekretorische Erschöpfung ¹⁵ - irreguläre endometriale Differenzierung ^{1,2,5,15}
¹ AUPPERLE et al. 2003, ² ELLENBERGER et al. 2004, ³ GRÜNINGER 1996, ⁴ GRÜNINGER et al. 1998, ⁵ HÄFNER 1999, ⁶ KASPAR et al. 1987, ⁷ KENNEY 1978, ⁸ KENNEY und DOIG 1986, ⁹ OIKAWA et al. 1993, ¹⁰ RAILA 2000, ¹¹ SCHOON et al. 1992, ¹² SCHOON et al. 1993, ¹³ SCHOON et al. 1994b, ¹⁴ SCHOON et al. 1995, ¹⁵ SCHOON et al. 1997	

Dabei ändert sich die glanduläre Morphologie sowohl histologisch als auch immunhistologisch im Vergleich zum umliegenden Endometrium (BRUNCKHORST et al. 1991, AUPPERLE 1997, RAILA 2000, AUPPERLE et al. 2004). Ein zyklusasynchroner Nachweis von Hormonrezeptoren (ER, PR) belegt eine Abkopplung von den regulären Steuerungsprozessen im Endometrium (RAILA et al. 1997).

Eine weitere Folge der Endometrose ist eine gestörte Proteinsekretion der involvierten Drüsenzellen, die zu einer Beeinträchtigung der Fertilität durch Veränderung des uterinen Milieus führt (HINRICHS und KENNEY 1989, STEWART et al. 2000a, WALTER et al. 2001, HOFFMANN et al. 2009b). UF ist meist durch eine erhöhte Expression innerhalb der fibrotischen Herde gekennzeichnet, dagegen weisen UG und UK vorwiegend eine verminderte Expression im Vergleich zu den unveränderten Arealen auf (HOFFMANN et al. 2009b). Diese qualitative und quantitative Abweichung der Proteinzusammensetzung kann zu einer

unzureichenden Versorgung des Embryos und nachfolgend zu einem Fruchttod führen (BRACHER et al. 1997, FERREIRA-DIAS et al. 1999, HEIN 2001, HOFFMANN et al. 2009b). Die Ätiologie der Endometrose ist bis heute unbekannt. Mögliche Einflussfaktoren sind in zahlreichen Studien untersucht worden. Festgestellt werden konnte, dass der Grad der Endometrose altersassoziiert zunimmt und keine Korrelation zu der Anzahl der Abfohlungen besteht (RICKETTS und ALONSO 1991, SCHOON et al. 1995, HEILKENBRINKER et al. 1997, ARESU et al. 2012). Auch jahreszeitliche oder zyklusassoziierte Veränderungen können nicht beobachtet werden (HOFFMANN 2006). Ein Drittel der untersuchten Stuten mit einer Endometrose zeigen bei SCHOON et al. (1995) gleichzeitig eine chronische Endometritis. Bei dem Vorliegen einer destruierenden Endometrose sind häufiger zugleich Endometritiden nachweisbar (HOFFMANN 2006). Ein Einfluss der Endometritis auf den Grad und das Erscheinungsbild der Endometrose kann von HOFFMANN (2006) und LEHMANN (2010) jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.4.1.2 Endometritis

Als Endometritis werden alle entzündlichen Prozesse des Endometriums bezeichnet, die qualitativ sowie quantitativ über die physiologische zyklische Selbstreinigung hinausgehen, unabhängig von ihrer Ätiologie (SCHOON et al. 1994).

Die Charakterisierung der entzündlichen Veränderung erfolgt anhand des vorkommenden Zelltyps, der Lokalisation der Entzündungszellen und der Verteilung sowie dem Grad der Infiltration (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1992).

Die akute Endometritis ist durch eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Eine katarrhalisch-eitrige Endometritis ist klinisch und zytologisch eindeutig zu diagnostizieren (SCHOON et al. 1997). Eine chronische Entzündung des Endometriums wird dagegen durch das Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen charakterisiert und ist meist klinisch inapparent und lediglich mit einer Uterusbiopsie festzustellen (SCHOON et al. 1992). Weiterhin können Makrophagen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten im Endometrium der Stute nachgewiesen werden (vgl. Kap. 2.4.2, S. 17).

Die zellulären Infiltrate können diffus sowie periglandulär akzentuiert verteilt sein oder follikuläre Aggregate bilden und kommen innerhalb des luminalen Epithels, im Stratum compactum und im Stratum spongiosum vor (GORDON und SARTIN 1978, KENNEY und DOIG 1986, SCHOON et al. 1992).

Die Kontamination des Uterus mit infektiösen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) nach dem Belegen oder dem Abfohlen kann eine sogenannte erregerinduzierte Endometritis, auslösen (CAUSEY 2006). Daneben können physikalische (WILLIAMSON et al. 1987), thermische, chemische und allergische Noxen eine Entzündung im Uterus auslösen.

Nach der Besamung kann physiologisch eine kurzzeitige, akute Entzündungsreaktion des Endometriums mit Flüssigkeitsansammlung beobachtet werden. Dieser Prozess wird als „physiologische transiente Endometritis“ bezeichnet (TROEDSSON 1999, AURICH 2009, LEBLANC 2010). Es handelt sich um eine komplexe Interaktion zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort (neutrophile Granulozyten, Immunglobuline, chemotaktische Me-

diatoren), physikalischer/mechanischer Clearance (Lymphdrainage, Uteruskontraktion) und anatomischer Barriere (Vulva, Hymenalring, Zervix), um das Fremdmaterial (Spermien, Seminalplasma, Verdünner) im Uterus innerhalb von 48 bis 72 Stunden zu beseitigen. In diesem Zusammenhang wird zwischen resistenten („resistent mares“ RM) und empfänglichen („susceptible mares“ SM) Stuten unterschieden, je nachdem, ob die Stute die Entzündung innerhalb von 72 Stunden (RM) eliminieren kann (WATSON 1988, KATILA 1996). Bei empfänglichen Stuten (SM) dauert der entzündliche Vorgang über diese Zeit hinaus an, so dass aufgrund der embryotoxischen Substanzen eine Trächtigkeit ausbleibt. Dieser Zustand wird als „besamungsinduzierte, persistierende Endometritis“ (post-breeding induced endometritis, PBIE) bezeichnet (WATSON et al. 1987b, KATILA 2012), wobei die Entzündung ohne Beteiligung von bakteriellen Erregern vorkommt. Eine sekundäre Infektion durch eine Kontamination mit fakultativ pathogenen Erregern ist jedoch möglich.

Als prädisponierende Faktoren sind generell mangelhafter Schamsschluß und Zervixfunktion, ein ventral orientierter Uterus sowie eine myometriale Kontraktionsschwäche und eine herabgesetzte lymphatische Drainage zu nennen (CAUSEY 2006, LEBLANC und CAUSEY 2009). Pathologische Befunde wie degenerative fibrotische Veränderungen des Endometriums und der endometrialen Gefäße beeinflussen zusätzlich die uterine Clearance. Diese Faktoren treten häufiger bei älteren, multiparen Stuten auf und behindern den Selbstreinigungsprozess der Gebärmutter (EVANS et al. 1987, LIU 1988). Zusätzlich ist eine höhere Empfänglichkeit des Uterus für Infektionen unter Progesterondominanz nachgewiesen.

In zahlreichen Studien wurde das uterine Immunsystem der RM und SM untersucht und verglichen. Dabei wurde die Anzahl und Funktionalität neutrophilen Granulozyten (ASBURY et al. 1982), das Vorkommen von Immunglobulinen (MITCHELL et al. 1982, WATSON 1988) und Zytokinen untersucht (FUMUSO et al. 2003, WOODWARD et al. 2012). Zum Beispiel ist das Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, zuständig für die immunologische Homöostase, bei Endometritis-resistenten und -empfänglichen Stuten unterschiedlich (FUMUSO et al. 2003, WOODWARD et al. 2012). Dabei weisen resistente Stuten höhere IL-10-Konzentrationen auf, das eine anti-inflammatorische Wirkung hat.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind allerdings teils widersprechend und so sind bis heute die exakten Pathomechanismen, die zur Persistenz der Endometritis führen, nicht vollständig geklärt. Insbesondere fehlen genaue Verlaufsuntersuchungen zu den Entzündungen im Uterus nach der akuten Phase (KATILA 2012).

2.4.2 Zelluläre Infiltrationen

2.4.2.1 Neutrophile Granulozyten

Im Endometrium der Stuten tritt diese Zellpopulation während des *Zyklus* im Östrus vermehrt in den Gefäßen (Leukozytostase; KENNEY 1978) sowie im Stratum compactum und im luminalen Epithel auf (BRUNCKHORST et al. 1991, BEUKE 2001). Dabei beeinflusst Östrogen positiv die Migration und Phagozytosekapazität der Zellen (WASHBURN et al. 1982, ASBURY et al. 1982, LIU 1988).

Nach Induktion einer *Endometritis* (bakteriell, besamungsinduziert) wandern neutrophile Granulozyten innerhalb von einer Stunde aus der Blutbahn in den Uterus ein, ihre maximale Anzahl wird nach sechs bis 12 Stunden erreicht. Im weiteren Verlauf vermindert sich ihre Anzahl wieder, dies ist detailliert bei der besamungsinduzierten transienten Endometritis beschrieben (WATSON et al. 1987b, BEUKE 2001, QUETIN et al. 2001). Zudem können neutrophile Granulozyten auch bei ausschließlich physikalischer Stimulation des Uterus im Endometrium beobachtet werden (WILLIAMSON et al. 1987). Neutrophile Granulozyten sind als Phagozyten an der unspezifischen Infektionsabwehr beteiligt, dabei dient die Phagozytose zur Abtötung und Verdauung von Fremdmaterial z.B. durch zytotoxische Sauerstoffmetaboliten (LIEBICH 2004, WELSCH 2006).

2.4.2.2 Makrophagen

Über das Vorkommen dieser Zellpopulation während des *Zyklus* und die Verteilung im Endometrium der Stute existieren unterschiedliche Angaben. Während nach SUMMERFIELD und WATSON (1998) Makrophagen kein zyklusassoziiertes/hormonbedingtes Vorkommen zeigen, weisen BRUNCKHORST et al. (1991) sie vermehrt in der Sekretionsphase nach. Eine Verteilung der Makrophagen überwiegend im Stratum compactum weist QUETIN (2001) nach, BEUKE (2001) dagegen eine gleichmäßige Verteilung in Stratum compactum und spongiosum, in der Studie von SUMMERFIELD und WATSON (1998) tritt diese Zellpopulation vorwiegend im Stratum spongiosum auf. Im luminalen Epithel werden Makrophagen nach BEUKE (2001) und SUMMERFIELD und WATSON (1998) nicht beobachtet, dagegen beschreiben BRUNCKHORST et al. (1991) und QUETIN (2001) das Auftreten dieser Zellen zwischen den Epithelzellen.

Nach Beginn einer akuten *Endometritis* treten Makrophagen im Uterus nach drei bis vier Tagen auf, zudem ist die Zellpopulation bei chronischen Entzündungen nachweisbar (BEUKE 2001, QUETIN 2001, JISCHA et al. 2008). Makrophagen sind, ebenso wie die neutrophilen Granulozyten, an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Die Fähigkeit zur Migration, Phagozytose und Zytotoxizität ähnelt der neutrophiler Granulozyten (vgl. 2.4.2.1, S. 17). Zudem sind Makrophagen Antigen-präsentierende Zellen und aktivieren MHCII Lymphozyten und infolgedessen eine spezifische Immunantwort. Außerdem treten sie bei Fremdkörperreaktionen auf und verschmelzen dabei zu mehrkernigen Synzytien (WELSCH 2006).

2.4.2.3 Lymphozyten und Plasmazellen

Im Endometrium der Stute treten Lymphozyten physiologisch auf und die Anzahl unterliegt dabei keinen *zyklus*assoziierten Schwankungen. Dabei sind die Zellen überwiegend im Stratum compactum (WATSON und DIXON 1993, WATSON und THOMSON 1996, BEUKE 2001), aber auch im Epithelverband sowie periglandulär und perivaskulär zu finden. Die B-Zelldichte ist generell gering (WATSON und THOMSON 1996). Plasmazellen sind aktivierte B-Zellen (WELSCH 2006) und im equinen Endometrium vermehrt im Stratum compactum und periglandulär nachweisbar (KENNEY 1978).

Die Anzahl von Lymphozyten (T-/B-Lymphozyten) und Plasmazellen steigt bei dem Vorliegen einer chronischen *Endometritis* (KENNEY 1978, MITCHELL et al. 1982, WAELCHLI und WINDER 1991, WATSON und THOMSON 1996, QUETIN et al. 2001). Lymphozyten haben eine zytotoxische Wirkung und stimulieren Makrophagen (WELSCH 2006). Plasmazellen sezernieren Antikörper (IgA, IgG), dies wird als Hinweis auf eine Antigenpersistenz gedeutet (KENNEY 1978). Die Zellpopulationen dienen als lokales, spezifisches Immunsystem der Uterusschleimhaut (LIEBICH 2004).

2.4.2.4 Mastzellen

Die Anzahl schwankt *zyklusabhängig* (SCHULZ 1997), dabei wird ein vermehrtes Auftreten im späten Interöstrus und Proöstrus beschrieben (GILBERT 1992, BLÜTHGEN 2003). Im Endometrium von ovariectomierten Stuten sind, im Gegensatz zu einem zyklischen Endometrium, keine bzw. nur wenig Mastzellen zu finden (SCHULZ 1997). Mastzellen treten überwiegend im Stratum spongiosum auf (SCHULZ 1997, QUETIN 2001, BEUKE 2001, BLÜTHGEN 2003) und sind nicht im luminalen Epithel nachweisbar (WELLE et al. 1997).

Die endometriale Mastzelldichte von Stuten, die ein unverändertes Endometrium oder eine *Endometritis* aufweisen, unterscheidet sich statistisch nicht (SCHULZ 1997). Jedoch ist die Anzahl bei pathologischen Alterationen, wie einer hochgradigen Endometrose und einer Atrophie des Endometriums in der physiologischen Decksaison vermindert (SCHULZ 1997). Mastzellen sind an Überempfindlichkeitsreaktionen (Typ-I und Typ-II) beteiligt, wobei eine Degranulation der Zellen zu allergischen Symptomen (Ödem, Hyperämie) führt. Dies kann auch durch entzündliche Stimuli ausgelöst werden. Die zytoplasmatischen Granula beinhalten Mediatoren, wie Histamin, Heparin, Arachidonsäureprodukte und andere chemotaktische Faktoren, wie Zytokine (IL-1, TNF- α). Zudem spielen Mastzellen eine wichtige Rolle in der Wundheilung und bei der Immunität gegen Parasiten (WELSCH 2006).

2.4.2.5 Eosinophile Granulozyten

Im Endometrium der Stute wird das Vorkommen von wenigen eosinophilen Granulozyten als physiologisch betrachtet (KENNEY 1978, BRUNCKHORST et al. 1991, BEUKE 2001, BLÜTHGEN 2003). Sie sind vermehrt im Stratum compactum nachweisbar (QUETIN 2001). Die Zunahme der Zellpopulation unterliegt *zyklusassozierten* Schwankungen, dabei wirkt Östrogen fördernd und Progesteron hemmend auf die Migration der Zellen. Folglich sind im Östrus vermehrt eosinophile Granulozyten zu beobachten (BRUNCKHORST et al. 1991). Die hormonabhängigen Veränderungen werden durch das vollständige Fehlen von eosinophilen Granulozyten bei ovariectomierten Stuten und durch die Verminderung der Zellzahl in inaktiven Endometrien bestätigt. Auch bei Stuten mit einer Hydromukometra, bei welchen der Progesteronspiegel niedriger während des Interöstrus ist im Vergleich zu Stuten ohne endometriale Alterationen (ÖZGEN et al. 2002), ist die Anzahl der eosinophilen Granulozyten vermindert (BLÜTHGEN 2003).

Die Zellpopulation tritt in akut eitrigen *Endometritiden* häufiger auf, jedoch bei nicht-eitrigen Entzündungen, Endometrosen und irregulär differenzierten Endometrien in geringerer Anzahl

(BLÜTHGEN 2003). Die „Endometritis eosinophila“ wird durch ein massenhaftes Vorkommen von eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet (SCHOON et al. 1997, QUETIN 2001). Eosinophile Granulozyten können toxische Sauerstoffmetabolite und Zytokine bilden. Sie treten bei Überempfindlichkeitsreaktion von Soforttyp auf und sind zur Phagozytose fähig. Nach IgE-Antigen-Kontakt erfolgt eine Degranulation, dabei wirken die Enzyme toxisch auf Parasiten, regen die Histamin-Freisetzung von Mastzellen an und hemmen die T-Zell-Proliferation (WELSCH 2006).

2.4.3 Endometriumbiopsie als diagnostisches Mittel

Die Endometriumbiopsie ist ein häufig eingesetztes diagnostisches Routineverfahren in der Stutengynäkologie (ARBEITER et al. 1976, KENNEY und DOIG 1986, SCHOON et al. 1992, SNIDER et al. 2011). Die histopathologische Beurteilung einer Biopsie ist eine zuverlässige und aussagekräftige Methode zur Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen (SCHOON et al. 1992, SCHOON et al. 1994). Zu den Indikationen zählen Subfertilität, Abort oder frühembryonaler Fruchttod, Inaktivität oder Zyklusanomalien während der physiologischen Decksaison sowie die Zuchtauglichkeitsuntersuchung (WÄELCHLI und WINDER 1987, SCHOON et al. 1994, SNIDER et al. 2011). Bei einer bestehenden Trächtigkeit ist die Entnahme kontraindiziert (KENNEY und DOIG 1986).

In der histopathologischen Untersuchung wird sowohl der Funktionszustand des Endometriums als auch die Qualität und Quantität entzündlicher und degenerativer Veränderungen erfasst (SCHOON et al. 1997). Anhand der Befunde und der Güstzeit ist eine Kategorisierung nach dem Schema von KENNEY und DOIG (1986), modifiziert von SCHOON et al. (1992), möglich (vgl. Tab. 2.3, S. 21). Die Kategorie ermöglicht eine statistische Angabe einer zu erwartenden Abfohlrate (VAN CAMP 1988, RICKETTS und BARRELET 1997, SCHLAFFER 2007).

Nach SCHOON und SCHOON (2003) bleiben allerdings bei der Kategorisierung wichtige Befunde, die signifikante Auswirkungen auf die Abfohlrate besitzen, unberücksichtigt. Dazu zählen endometriale Fehldifferenzierungen, die Qualität der Endometrose, schwere Angiosklerosen, der potentiell destruierende Charakter der Endometrose und das Alter der Stute (HEILKENBRINKER et al. 1997). Eine individuelle Bewertung der einzelnen Stute unter Berücksichtigung aller relevanten Faktoren ist nötig, um die Prognose zu konkretisieren (SCHOON und SCHOON 2003). Die Entnahme eines Endometriumbiopsates kann in jeder Zyklusphase erfolgen, ist minimal invasiv und risikoarm (KENNEY und DOIG 1986), wobei keine signifikante Schädigung des Endometriums auftritt (ARBEITER et al. 1976, WATSON und SERTICH 1992). Allerdings kann eine Verkürzung des Zyklus eintreten, wenn die Probe zu Beginn des Interöstrus entnommen wird, dabei ist der folgende Östrus verlängert. Bei einer Biopsientnahme im Östrus oder frühestens 12 Tage p.ov. ist mit keiner Veränderung in der Zykluslänge zu rechnen (HURTGEN und WHITMORE 1978, BRUNCKHORST et al. 1991). Obwohl die Endometriumbiopsie nur 0,1% der Oberfläche reflektiert (KENNEY und DOIG 1986), gilt sie als repräsentativ, wenn der Uterus klinisch unauffällig ist oder diffuse endometriale Veränderungen auftreten.

Tab. 2.3: Kategorisierungsschema von KENNEY und DOIG (1986),
modifiziert nach SCHOON et al. (1992)

Kategorie / Abfohlrate	Befunde
Kategorie I / 80-90 %	<ul style="list-style-type: none"> - unverändertes Endometrium - vereinzelte ggr. Fibrosierungsherde - vereinzelte ggr. Entzündungsherde
Kategorie IIa / 50-80 %	<ul style="list-style-type: none"> - ggr.-mgr. diffuse Entzündungszellinfiltrate im Str. comp., zahlreiche disseminierte Herde im Str. comp. / spong. - ggr.-mgr. disseminierte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (1-3 Schichten, < 2 Herde/5 mm) - ggr. Lymphlakunen - partielle Atrophie in der physiologischen Decksaison
Kategorie IIb / 10-50 %	<ul style="list-style-type: none"> - Kombination zweier Kategorie IIa-Befunde - Kategorie IIa-Stuten, mehr als 2 Jahre güst - mgr. diffuse/hgr. fokale Entzündungszellinfiltrate - mgr. gleichmäßig verteilte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (5-10 Schichten, 2-4 Herde/5 mm) - mgr. Lymphlakunen
Kategorie III / < 10%	<ul style="list-style-type: none"> - Kombination zweier Kategorie IIb-Befunde - hgr. diffuse Entzündungszellinfiltrate - hgr. gleichmäßig verteilte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (> 10 Schichten, > 4 Herde/5 mm) - hgr. Lymphlakunen (rektal palpierbar) - Atrophie in der physiologischen Decksaison

Legende zu Tab. 2.3: ggr.: geringgradig; mgr.: mittelgradig; hgr.: hochgradig; Entz.: Entzündungs-;
Str. comp.: Stratum compactum; Str. spong.: Stratum spongiosum

2.5 Rosseunterdrückung bei Pferden

2.5.1 Methoden zur Rosseunterdrückung

Die verschiedenen Behandlungsweisen zur Rosseunterdrückung werden in vier Kategorien eingeteilt, (1) die Gabe von exogenem Progesteron/Progestin, (2) die Verlängerung der lutealen Phase, (3) die Unterdrückung der ovariellen follikulären Aktivität sowie (4) die Ovariectomie (VANDERWALL und NIE 2011). Eine Übersicht über einige angewandte Praktiken gibt Tabelle 2.4. Die einzelnen Methoden weisen verschiedene Vorteile und Nachteile auf. Der (1) Einsatz von Progesteron/Progestin erzeugt künstlich einen Diöstrus und ist sehr effektiv (LOY und SWAN 1966, DAELS et al. 1996, MACHNIK et al. 2007). Allerdings muss eine tägliche Verabreichung erfolgen, die mit hohen Kosten verbunden ist.

Die (2) Verlängerung der lutealen Phase kann durch mehrere Verfahren erreicht werden. Der manuelle Einsatz von *intrauterinen Bällen* (intrauterine devices: IUDs siehe Kap. 2.5.3, S. 24) ist eine Möglichkeit. Die Bälle stellen eine reversible, risikoarme und dopingfreie Methode dar, um die Rossesymptomatik zu unterdrücken, allerdings ist ihre Effektivität als niedrig einzustufen (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010).

Tab. 2.4: Übersicht zu verschiedenen Methoden der Rosseunterdrückung (Pferd)

Behandlungsweise	Methode
(1) Gabe von Progesteron/Progestin	Progesteron (i.m.) ¹
	Altrenogest (p.o.) ^{2,3,4}
(2) Verlängerung der lutealen Phase	Einsatz intrauteriner devices (IUD) ^{5,6,7}
	Gabe von exogenem Oxytocin (i.m., i.v.) ^{8,9,10}
	Induktion einer diöstrische Ovulation ¹¹
	Trächtigkeitsabbruch an Tag 16 bis 22 ¹²
(3) Unterdrückung der ovariellen follikulären Aktivität	GnRH Agonisten ^{13,14,15}
	GnRH Antagonisten ^{16,17,18}
	aktive Immunisierung gegen GnRH ^{19,20,21}
(4) Ovariectomie	Laparotomie, Laparoskopie ^{22,23}
Legende zu Tab. 2.4: ¹ LOY und SWAN 1966, ² WEBEL und SQUIRES 1982, ³ DAELS et al. 1996, ⁴ MACHNIK et al. 2007, ⁵ NIE et al. 2003a, ⁶ RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ⁷ ARGO und TURNBULL 2010, ⁸ NEELY et al. 1979b, ⁹ VANDERWALL et al. 2007, ¹⁰ KEITH et al. 2013, ¹¹ HEDBERG et al. 2006, ¹² LEFRANC und ALLEN 2004, ¹³ MUMFORD et al. 1995, ¹⁴ JOHNSON et al. 2000, ¹⁵ HENDERSON et al. 2012, ¹⁶ WATSON et al. 2000, ¹⁷ BRIANT et al. 2003, ¹⁸ EVANS et al. 2011, ¹⁹ GARZA et al. 1986, ²⁰ IMBODEN et al. 2006, ²¹ SCHULMAN et al. 2013, ²² SCOTT und KUNZE 1977, ²³ PALMER 1993; GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormon	

Eine wiederholte (i.m., 8-20 d) bzw. kontinuierliche (s.c. Minipumpe, 7-14 d) Verabreichung von exogenem *Oxytocin* hemmt die Luteolyse durch eine Desensibilisierung der Oxytocin-

rezeptoren und daraus folgender verminderten $\text{PGF}_{2\alpha}$ Freisetzung, welches luteolytisch wirkt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer jederzeit möglichen Unterbrechung der verlängerten lutealen Phase durch das „Antidot“ $\text{PGF}_{2\alpha}$. Jedoch ist durch den hohen Aufwand und die entstehenden Kosten die Gabe von Oxytocin für die Praxis nicht geeignet (NEELY et al. 1979, VANDERWALL et al. 2007, KEITH et al. 2013). Zudem ist der Einsatz im Turniersport durch die Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN, Fédération Equestre Nationale) aufgestellten Anti-Doping- und Medikamentenkontroll-Regeln (ADMR, 2013) untersagt.

HEDBERG et al. (2006) induzieren während der lutealen Phase mittels hCG (i.m.) bei dem Vorliegen eines über 30 mm großen *diöstrischen Follikels* eine Ovulation. Im Anschluss entwickeln die Stuten durch die Bildung eines Corpus luteum eine verlängerte luteale Phase. Allerdings zeigen nicht alle Stuten einen ≥ 30 mm großen diöstrischen Follikel und die Überwachung der Tiere ist sehr zeitaufwändig, wodurch die Praktikabilität dieser Methode fraglich ist. Das Besamen der Stute mit folgendem *Abbruch der Gravidität* nach maternaler Trächtigkeitserkennung führt zur Induktion eines Corpus luteum persistens, dieses Verfahren muss jedoch aufgrund ethischer Aspekte kritisch beurteilt werden (LEFRANC und ALLEN 2004).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die (3) Unterdrückung der ovariellen follikulären Aktivität (Östrogenproduktion). Hier stehen GnRH Agonisten (MUMFORD et al. 1995, JOHNSON et al. 2000, HENDERSON et al. 2012), Antagonisten (WATSON et al. 2000, BRIANT et al. 2003, EVANS et al. 2011) und Vakzine (GARZA et al. 1986, IMBODEN et al. 2006, SCHULMAN et al. 2013) zur Verfügung. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung der Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus und folglich in einer Reduktion der FSH- und LH-Freisetzung aus der Hypophyse. Die Ausbildung eines dominanten Follikel und somit die Ovulation wird unterbunden, wodurch künstlich ein Anöstrus in der physiologischen Decksaison ausgelöst wird. Allerdings sind große individuelle Schwankungen in der Effektivität und Dauer der ovariellen Inaktivität zu beobachten (STOUT 2004).

Als letzte Alternative wird häufig eine (4) Ovariectomie (Kastration) durchgeführt, diese ist irreversibel und eine spätere Zuchtnutzung somit ausgeschlossen. Zudem sind das Operationsrisiko und die Kosten als nachteilig einzustufen (SCOTT und KUNZE 1977, HOOPER et al. 1993, KAMM und HENDRICKSON 2007).

Die hier vorgestellte Auswahl an Möglichkeiten zur Rosseunterdrückung bei der Stute zeigt, dass jede Methode Vor- und Nachteile aufweist und bis heute noch keine ideale Lösung für diese Problematik gefunden worden ist.

2.5.2 Intrauterine devices (IUDs)

2.5.2.1 Allgemeine Betrachtung

Das Intrauterinpeppar (engl. intrauterine device: IUD; Synonym: Spirale) ist ein zur Kontrazeption in die Uterushöhle eingelegtes Gebilde unterschiedlicher Form und Größe. Unterschieden wird zwischen inaktiven und aktiven Intrauterinpepparen. Zu den aktiven Formen zählen die kupferhaltigen und gestagenhaltigen IUDs, während inaktive Formen keine Wirkstoffe freisetzen (PSCHYREMBEL 2006).

Als Kontrazeptivum werden aktive und inaktive IUDs bei Menschen (RICHTER 1909, LIPPES 1965, HORCAJADAS et al. 2006), landwirtschaftlichen Nutztieren (GINTHER et al. 1966, TURIN et al. 1997, FORDYCE et al. 2001), Labortieren (DOYLE und MARGOLIS 1963, QIU et al. 2012) und auch beim Pferd (DAELS und HUGHES 1995, KILLIAN et al. 2008) eingesetzt. Der antifertile Wirkmechanismus der IUDs variiert zwischen den verschiedenen Spezies (Einfluss auf Ovulation, Spermientransport, Befruchtung, Implantation). Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der durchgeführten Studien zwischen den Spezies nur begrenzt übertragbar (ECKSTEIN 1970, ORTIZ et al. 1996). Das einheitliche Prinzip des antifertilen Effekts der IUDs liegt in einer lokalen Fremdkörper-Reaktion (DOYLE und MARGOLIS 1964, EL SAHWI und MOYER 1970, ABDELGAWAD et al. 1977, FORDYCE et al. 2001, GRIMMETT et al. 2002). Diese Entzündung ist bei korrektem Einsatz der IUDs steril (MISHELL, JR. et al. 1966, FORDYCE et al. 2001), dabei dominieren in der ersten Woche neutrophile Granulozyten (PARR et al. 1967), anschließend wandern Makrophagen in das Uteruslumen (SAGIROGLU und SAGIROGLU 1970, MARTIN und BROWN 1973). Bei Labortieren sowie der Frau ist die Wirkung der IUDs auf den Uterus beschränkt (lokal) und der ovarielle Zyklus bleibt ungestört (DOYLE und MARGOLIS 1964, FAHMY et al. 1991). Wiederkäuer dagegen weisen teils extrauterine Effekte wie ovarielle Dysfunktionen auf, die möglicherweise durch den Einfluss der IUDs auf die GnRH-Sekretion in der Hypophyse (systemische Wirkung) zurückzuführen sind (JANAKIRAMAN et al. 1970, TURIN et al. 1997). Je nach Zeitpunkt des uterinen Einsatzes der IUDs wird der Zyklus verkürzt, verlängert oder bleibt unverändert (NALBANDOV et al. 1955). Auch beim Kaninchen wird ein neuroendokriner Mechanismus vermutet (Hypothalamus-Hypophysen-Achse /Signalweg Uterus-Ovar), da die Ovulation gehemmt wird (JANAKIRAMAN und CASIDA 1968, BHALLA und CASIDA 1970). Die tierartspezifische uterine Empfänglichkeit für Infektionen, die unterschiedliche Ausführung der Experimente, der Gebrauch verschiedener IUDs hinsichtlich Größe, Form und Material sowie der heterogene Einsatz von Medikamenten zum Schutz vor Infektionen führt zu abweichenden Ergebnissen der IUDs in der Trächtigkeitsverhütung, so dass der exakte Mechanismus trotz umfangreicher Forschung bis heute nicht endgültig geklärt ist. Die Rosseunterdrückung durch IUDs bei Pferden wird durch eine Verlängerung der lutealen Phase erreicht, indem die Luteolyse des Gelbkörpers im Ovar gehemmt wird (RIVERA DEL ALAMO et al. 2008). Diese Beobachtung lässt eine extrauterine Wirkung der IUDs, wie sie bei Wiederkäuern und Kaninchen vorkommt, vermuten. Jedoch ist dieser Mechanismus der IUDs bis heute nicht verstanden bzw. sicher nachgewiesen.

2.5.3 IUDs zur Rosseunterdrückung bei Pferden

Intrauterine Devices (IUDs) werden zur Unterdrückung der Rossessymptomen seit vielen Jahren in der Pferdepraxis eingesetzt (MEYER 2003). Die Behandlungsmethode ist allerdings nur vereinzelt in der Literatur beschrieben und exakte wissenschaftliche Studien sind erst seit 2000 bekannt. Dr. Randy J.T. de Greef berichtet 2000 im „Equine Clinicians Network“ von dem Einsatz intrauteriner Bälle zur Rosseunterdrückung mit einer Effektivität von 75 % (NIE et al. 2003a). In den folgenden Jahren (2001 bis 2010) wurden fünf Studien in verschiedenen

Ländern zum Wirkmechanismus und zur Effizienz durchgeführt (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010).

Zwei Hypothesen zur Rosseunterdrückung durch IUDs werden im Zusammenhang mit dem Bericht von Dr. Randy J.T. de Greef im „Equine Clinicians Network“ diskutiert (NIE et al. 2003a). Zum Einen die Imitation eines Embryos durch den Ball, wobei die mechanische Stimulation des Uterus eine Prostaglandin-Ausschüttung des Endometriums und somit die Luteolyse verhindern soll. Zum Anderen wird eine geringgradige chronische Endometritis vermutet, ausgelöst durch die mechanische Irritation durch den Ball, es erfolgt eine kontinuierliche, geringe Prostaglandin-Freisetzung, die unzureichend für eine Luteolyse ist (NIE et al. 2003a).

Ein direkter Vergleich der fünf Studien kann nicht erfolgen, da Tiergut, Material und Methoden sich deutlich unterscheiden (vgl. Tab. 2.5).

Tiergut

Die Anzahl der Stuten (n = 9-38) sowie die eingesetzten Pferderassen variieren stark zwischen den Studien (vgl. Tab. 2.5). Das Tiergut von ARGO und TURNBULL (2010) unterscheidet sich von den anderen Versuchen insbesondere durch den Einsatz sehr junger Ponys.

Tab. 2.5: Vergleichende Untersuchungen zu Tiergut und Material der IUD-Studien

Studie, Jahr	NIE et al. 2003a	MEYER 2003	HOLM und JESPERSEN 2003	RIVERA DEL ALAMO et al. 2008	ARGO und TURNBULL 2010
IUD-Material	Glas	Glas/Silber	Kupfer	wassergefüllt, Plastik	Glas
Größe (mm)	25 / 35	15 / 25	10	20	35
Gewicht (g)	k.A.	11,8 / 18,7	1,16	3,6	k.A.
Alter in J. (Mittelwert)	3-20 (9,4)	k.A.	7-10 (8,3)	3-17 (9,4)	2-6 (4,6)
Rasse	leichte Rassen	verschiedene Pferderassen	Fjordpferd Warmblut Traber	Finnpferd Standardbred Warmblut	Welsh Mountain Pony

Legende zu Tab. 2.5: k.A.: keine Angaben; J.: Jahr; mm: Milimeter; g: Gramm

IUD-Material

MEYER (2003), NIE et al. (2003a) und ARGO und TURNBULL (2010) verwenden einen Ball aus Glas. MEYER (2003) nutzt in seinem zweiten Experiment eine Silberkugel mit größerem Gewicht und Durchmesser, um den Einfluss dieser zwei Faktoren zu untersuchen (vgl. Tab. 2.5). IUDs aus Kupfer werden bei der Frau zur Schwangerschaftsverhütung eingesetzt. Dabei werden Kupfer-Ionen in die intrauterine Flüssigkeit abgegeben, welche die Entzündung

dungsreaktion verstärken und toxisch auf die Spermatozoen wirken (ELSTEIN und FERRER 1973, ALVAREZ et al. 2012). Um vergleichbare Effekte bei Stuten zu erforschen, setzten HOLM und JESPERSEN (2003) Kupferbälle in ihrem Versuch ein. RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) analysierten insbesondere die Hypothese, dass der Ball den Embryo nachahmt. Der equine Embryo ist rund, frei beweglich und weist eine Größe von 20 mm am 13. Tag p.ov. auf (BETTERIDGE et al. 1982). Um ein strukturell ähnliches Gebilde zu verwenden, setzten RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) einen wassergefüllt Plastikball mit einem Durchmesser von 20 mm ein.

Method

Nicht nur die Gruppenzusammensetzung, sondern auch die Behandlungsprotokolle weisen zwischen den fünf Studien zu IUDs am Pferd deutliche Unterschiede auf.

Die IUDs werden in den Studien an unterschiedlichen Tagen des Zyklus (Tag 0 bis Tag 4 p.ov.) in den Uterus eingesetzt, wobei RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) den spätesten Zeitpunkt nach der Ovulation wählen (Tag 2 bis 4 p.ov.).

Im Zusammenhang mit dem Einsetzen der Bälle variiert neben dem Zeitpunkt auch die begleitende Medikamenten-Gabe (Antibiotika, Prostaglandin-Analoga). Der intrauterine Einsatz von Antibiotika wird in der Literatur kontrovers diskutiert (BENNETT et al. 1981, ALLEN 1993, PYCOCK und NEWCOMBE 1996, SHARMA et al. 2011), in der Studie von RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) wird kein Antibiotikum verwendet und sie unterscheidet sich in diesem Punkt von den übrigen Versuchen. Cloprostenol, ein Analogon zu dem natürlich vorkommenden Prostaglandin $F_{2\alpha}$, erhöht die myometriale Aktivität und unterstützt somit die uterine Clearance (GODDARD und ALLEN 1985, COMBS et al. 1995). NIE et al. (2003a) setzen dieses Medikament ein, um einer Endometritis durch eventuell eingebrachte Kontaminanten vorzubeugen. Einige Forschungsgruppen beobachten jedoch bei der Cloprostenol-Gabe p.ov. eine Beeinträchtigung der Corpus luteum-Funktion (TROEDSSON et al. 2001, NIE et al. 2003b), so dass RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) auf den Einsatz verzichten.

Eine intrauterine und/oder zervikale Manipulation kann einen Einfluss auf die Zykluslänge und das Hormonprofil bei Pferden ausüben (HURTGEN und GANJAM 1979, KALPOKAS et al. 2010). Damit diese Befunde die Untersuchungsergebnisse zwischen den IUD-Stuten und den Kontroll-Tieren nicht beeinflussen, führen RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) und ARGO und TURNBULL (2010) bei den Kontrolltieren ebenfalls eine Zervixmanipulation durch, die dem Einsatz von IUDs entspricht.

Auch jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Zykluslänge und des Hormonprofils spielen bei der Stute eine große Rolle (saisonal polyöstrisch), so dass die vorliegenden fünf Studien während der physiologischen Decksaison (Mai-Oktober) durchgeführt wurden.

Eine verlängerte luteale Phase (vLP) definieren NIE et al. (2003a) mit >35 Tagen, HOLM und JESPERSEN (2003) sowie RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) dagegen schon mit >23 Tagen. ARGO und TURNBULL (2010) liegen mit >31 Tagen dazwischen und MEYER (2003) macht hinsichtlich der Dauer der vLP keine Angaben.

Zudem ist der Untersuchungszeitraum, in der die Stuten überwacht werden, unterschiedlich lang. MEYER (2003) beobachtet die Tiere über einen Zyklus hinweg, während ARGO und TURNBULL (2010) teils fünf vollständige Zyklen verfolgen.

Ergebnisse

Die Versuchsansätze zeigen hinsichtlich der Verlängerung der lutealen Phase in den fünf Versuchen eine unterschiedliche Effektivität (vgl. Tab. 2.6). Bei NIE et al. (2003a) ist die Anzahl der IUD-Stuten mit einer vIP (7/18, 39%) größer als die Anzahl der Kontrolltiere, die spontan eine vIP ohne IUD (4/32, 13%) entwickeln. Werden jedoch alle untersuchten Zyklen (drei intraovulatorische Intervalle) der IUD-Stuten (62 Zyklen) und der Kontrolltiere (50 Zyklen) betrachtet, sind 4 von 50 (8 %) Zyklen der Kontrolltiere und 7 von 62 (11 %) Zyklen der IUD-Stuten verlängert und somit ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu ermitteln. Dieser Vergleich zeigt die niedrige Effektivität der IUDs. Zusätzlich ist die rIP der Kontrolltiere signifikant länger als die rIP der IUD-Stuten (NIE et al. 2003a). Die Kontrolltiere bei MEYER (2003) und HOLM und JESPERSEN (2003) entwickeln sogar teils häufiger eine vIP als die Versuchs-(IUD)-Stuten der Studie, allerdings ist die geringe Anzahl der Tiere der beiden Versuche ein limitierender Faktor. RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) erreichen mit 9 von 12 (76 %) IUD-Stuten mit vIP die höchste Erfolgsrate bei der Rosseunterdrückung mittels IUDs. Keine Unterschiede sind zwischen den Gruppen (Kontroll/IUD-Gruppen) von ARGO und TURNBULL (2010) nachzuweisen, die IUDs sind wirkungslos.

Tab. 2.6: Übersicht Ergebnisse der genannten IUD-Studien

Studie, Jahr	IUD-Stuten Länge der luteale Phase	Kontrolltiere Länge der luteale Phase	Stuten mit vIP
NIE et al. 2003a	IUDP: 87 (76 - 109) Tage IUDN: 20,2 +/- 0,41 Tage	23 +/- 0,43 Tage	Ko: 4/32 (13 %) IUD: 7/18 (39 %)
MEYER 2003	IUDP: I: 46, II: > 46 Tage IUDN: I: 23 Tage, II: 16,7 (18 - 23) Tage	39 (25-46) Tage	Ko: 2/3 (67 %) IUD: I: 1/3 (33 %) IUD: II: 1/3 (33 %)
HOLM und JESPERSEN 2003	IUDP: 31,2 +/- 4,8 Tage IUDN: 20,2 +/- 3,8 Tage	33,5 +/- 15,3 Tage	Ko: 2/3 (67 %) IUD: I: 0/5 (0 %) IUD: II: 5/5 (100 %)
RIVERA DEL ALAMO et al. 2008	IUDP: 61,4 +/- 2,1 Tage IUDN: 21,7 +/- 3,7 Tage	22,3 +/- 1,9 Tage	Ko: 0/12 (0 %) IUD: 9/12 (76 %)
ARGO und TURNBULL 2010	IUDN: 25,33 +/- 1,55 Tage	24,67 +/- 0,83 Tage	Ko: 1/12 (8 %) IUD: 1/12 (8 %)

Legende zu Tab. 2.6: +/- Tage: Standardabweichung; Ko: Kontrolltiere; IUD: intrauterine device, IUDP: IUD Positiv: verlängerte luteale Phase (vIP); IUDN: IUD Negativ: reguläre luteale Phase; I: Experiment I; II: Experiment II

Die Länge der vIP weist große Unterschiede zwischen den einzelnen Studien auf (vgl. Tab. 2.6, S. 27) und reicht von 31,2 Tagen (HOLM und JESPERSEN 2003) bis 87 Tagen (NIE et al. 2003a).

Unabhängig von der Rosseunterdrückung wurden weitere Beobachtungen angestellt, wie z.B. die Beweglichkeit der Bälle im Uterus. In den aufgeführten Studien rollen die IUDs nur mäßig durch die Gebärmutter (HOLM und JESPERSEN 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008), dagegen bewegt sich der Embryo während der langen Präimplantationsphase kontinuierlich durch den gesamten Uterus (ALLEN 2001).

In den Endometriumbiopsaten nach der Versuchsreihe können keine Veränderungen im Vergleich zu den Biopsaten vor Studienbeginn ermittelt werden (MEYER 2003, NIE et al. 2003a) und die Trächtigkeitsrate bleibt unbeeinflusst (NIE et al. 2003a).

In Einzelfällen tritt eine diöstrische Ovulation auf, so dass ein sekundärer Gelbkörper entsteht (MEYER 2003), meist wird die vIP jedoch durch ein primäres Corpus luteum persistent ausgelöst. In keiner Versuchsgruppe kann die Bildung von Corpora lutea accessorii beobachtet werden (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010).

NIE et al. (2003a) stellen fest, dass die IUD-Stuten mit vIP ein signifikant geringeres Alter aufweisen als IUD-Tiere mit regulärer lutealer Phase. Zudem werden die IUDs häufiger durch den Uterus „ausgeworfen“, wenn der Ball vor der Ovulation bei jungen Stuten eingesetzt wird.

In keiner der Studien wurde eine signifikant höhere Anzahl an Entzündungszellen mittels Zytologie oder Biopsie bei den IUD-Stuten nachgewiesen.

Diskussion

Die Autoren der angegebenen Studien kommen im Hinblick auf den Wirkmechanismus zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen.

NIE et al. (2003a) vermuten einen zusätzlichen Placeboeffekt bei den Besitzern, halten eine Endometritis für unwahrscheinlich und verweisen auf weitere Untersuchungen.

MEYER (2003) und HOLM und JESPERSEN (2003) weisen auf der Oberfläche der Kugeln einen braun-grünen, mukösen Belag nach. In der zytologischen Untersuchung des Belags konnten als dominierende Zellpopulation neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden, desweiteren Makrophagen, einzelne Riesenzellen und Lymphozyten. Die bakteriologische Untersuchung des Sekrets ist ohne Ergebnis (steril). Das Sekret um die IUDs wird als lokale aseptische eitrige Entzündung interpretiert (HOLM und JESPERSEN 2003). HOLM und JESPERSEN (2003) schlussfolgern, dass Kupferbälle zwar eine lokale Entzündung verursachen, können aber die Hypothese, dass die Bälle durch diesen Effekt eine vIP auslösen, nicht bestätigen. MEYER (2003) kann ebenfalls eine Verlängerung der lutealen Phase durch IUDs nicht beweisen.

Bei den IUD-Stuten mit vIP (IUDP) in der Studie von RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) ist eine herabgesetzte Uteruskontraktilität sowie eine verminderte pulsatile Ausschüttung des $\text{PGF}_{2\alpha}$ nachweisbar. Das Prostaglandin wird auf einem basalen Level freigesetzt mit vereinzelten Peaks, dagegen weisen die IUD-Stuten mit regulärer lutealer Phase und die Kontrolltiere mehrere aufeinanderfolgende Peaks vor der Luteolyse auf. Zusammenfassend vermuten RIVERA DEL ALAMO et al. (2008), dass die Bälle durch die mechanische Stimulation des Endometriums die Freisetzung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ verhindern und so die vIP auslösen. Diese Befunde ähneln nach RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) dem luteostatischen Effekt des Embryos.

Trotz fehlender Effektivität der IUDs in der Studie von ARGO und TURNBULL (2010) zeigen die IUD-Stuten eine verringerte Follikelgröße im Vergleich zu den Kontrolltieren. Aus diesen Befunden folgern ARGO und TURNBULL (2010), dass die Wirkung der IUDs am ehesten auf einen Placeboeffekt bei den Besitzern zurückzuführen ist, da die Zufriedenheit der Besitzer mit dem Behandlungserfolg über dem Anteil der IUD-Stuten mit vIP liegt. Zudem weisen ARGO und TURNBULL (2010) darauf hin, dass die Versuchstiere keine „Problem-Stuten“ mit einer übermäßigen Rossesymptomatik sind und somit eventuell kein geeignetes Tiergut darstellen, um den Effekt der IUDs zu erforschen. Insgesamt bleibt der Wirkmechanismus der IUDs bei Pferden somit weiter ungeklärt.

Zwei weitere Studien setzen IUDs bei Stuten ein, allerdings als Kontrazeptivum (DAELS und HUGHES 1995, KILLIAN et al. 2008). Die Stuten zeigen trotz IUD einen regulären Zyklus und werden von dem Hengst in der Herde gedeckt, eine Trächtigkeit wird in den meisten Fällen verhindert. DAELS und HUGHES (1995) weisen mittels Zytologie und Histologie eine geringgradige chronische Entzündung nach. KILLIAN et al. (2008) können sonographisch keine entzündlichen Veränderungen ermitteln. Das interovulatorische Intervall wird jedoch in beiden Studien nicht untersucht.

2.6 Fazit aus der Literatur bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit

Der Einsatz von intrauterinen Bällen zur Rosseunterdrückung bei Stuten erfolgt seit langer Zeit (NIE et al. 2003). Der exakte Wirkmechanismus ist allerdings bis heute unbekannt. In der vorhandenen Literatur werden zwei Hypothesen diskutiert: die Scheinträchtigkeit und eine geringgradige chronische Endometritis. Ebenso kann ein Placeboeffekt bei den Besitzern ohne eine unmittelbare Wirkung der IUDs nicht ausgeschlossen werden (NIE et al. 2003a, ARGO und TURNBULL 2010). Auch in der Humanmedizin und bei anderen Tierarten (Ratte, Rind) werden intrauterine Pessare verwendet, allerdings mit der Indikation einer Trächtigkeitsverhütung (RICHTER 1909, GINTHER et al. 1966, QUI et al. 2012). In diesem Zusammenhang liegen zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten vor, jedoch konnte auch hier der exakte Mechanismus bisher nicht ermittelt werden. Neben intrauterinen Effekten, werden auch extrauterine Wirkungen der IUDs, die den Zyklusverlauf bei einigen Tierarten beeinflussen, angenommen (ECKSTEIN 1970, FAHMY et al. 1991, TURIN et al. 1997). Es existieren zahlreiche Studien zur Histomorphologie des equinen Endometriums im Hinblick auf den Sexualzyklus, eine Trächtigkeit oder endometriale Alterationen wie Entzündungen oder einer Endometrose (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1992). Trotzdem können entscheidende Fragestellungen zur Reproduktion der Stute, wie z.B. der Ursprung des embryonalen Signals zur maternalen Trächtigkeitserkennung (ALLEN 2001) oder der auslösende Faktor zur Persistenz der physiologischen transienten Endometritis nach einer Belegung (KATILA 1996) bisher nicht abschließend beantwortet werden. Die uterine Funktion basiert auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem und der Endokrinologie, dabei muss die uterine Schleimhaut Spermien und die allogenetische Blastozyste tolerieren und gleichzeitig die Abwehr gegen Bakterien und Viren gewährleisten. Die Faktoren des Immunsystems (Entzündungszellen, endometriale Proteine) besitzen somit verschiedene Aufgaben während des Sexualzyklus, der Gravidität und im Falle einer Endometritis (LEA und SANDRA 2007, NORONHA und ANTCZAK 2010). Untersuchungen zum Einfluss intrauteriner Plastikbälle auf die histomorphologischen und immunhistologischen Befunde des equinen Endometriums sowie der Vergleich zu den entsprechenden Befunden im Endometrium von tragenden Stuten könnten einen Einblick in bisher ungeklärte Mechanismen der uterinen Funktion geben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher eine histomorphologische und immunhistologische Untersuchung equiner Endometriumbiopate nach Einsatz von IUDs und der Vergleich mit Biopaten tragender/zyklischer Stuten, um die Auswirkungen der intrauterinen Plastikbälle („small intrauterine devices“) auf das equine Endometrium zu ermitteln.

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiergut, Material und Probenherkunft

Für die Untersuchung standen insgesamt 30 Endometriumbioptate von 30 Stuten (Finnpferd, Standardbred, Warmblut) im Alter von 4 bis 17 Jahren (Median: 8,5 Jahre) zur Verfügung. Die Gewebeproben stammen aus dem Equine College Ypäjä und dem MTT Agrifood Research, Ypäjä in Finnland (n = 28) sowie der Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken der Tierärztlichen Hochschule Hannover (n = 2). Vor Entnahme der Bioptate wurden die Stuten klinisch-gynäkologisch und sonographisch untersucht und als genitalgesund eingestuft. Zudem waren vorherichtlich keine Reproduktionsstörungen bekannt. Die Biopsie erfolgte während der physiologischen Decksaison. Die Probenentnahme (Endometriumbiopsien) wurden beim Animal Experiment Board in Finnland (Eläinkoelautakunta-Ella) als Tierversuchsvorhaben angezeigt (Aktenzeichen ESLH-2008-00122/Ym-23).

3.2 Nähere Charakterisierung des Tiergutes

Die 30 Stuten wurden in zwei Gruppen (A, B) vergleichbaren Alters eingeteilt und im Rahmen der Studie jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag palpatorisch und ultrasonographisch untersucht. Bei der Ausbildung eines dominanten Follikels (Durchmesser ≥ 35 mm) erfolgte eine intravenöse Injektion von hCG (Chorulon vet 1500 IU/Intervet International B.V., Boxmeer, Niederlande) und eine tägliche palpatorische und rektale Examination bis zur Ovulation, welche mittels Ultraschall als Tag 0 dokumentiert wurde (Abb. 3.3, S. 33). Im weiteren Verlauf erfolgte bei **Gruppe A** eine präovulatorische Insemination (Besamungsdosis: 7-15 ml; $0,1 \times 10^9$ Spermatozoen/ml) 24 Stunden nach der hCG-Injektion (vgl. Gruppe A, S. 33) und bei **Gruppe B** der Einsatz eines intrauterinen Balles („small uterine device“) 3 Tage nach der Ovulation (vgl. Gruppe B, S. 33). Am Tag 15 p.ov. wurden die Pferde jeweils allgemein, klinisch-gynäkologisch und ultrasonographisch untersucht und im Anschluss ein Endometriumbioptat sowie eine Blutprobe zur Bestimmung der Serumprogesteron- und Serumöstradiolkonzentration gewonnen (Dr. Maria Montserrat Rivera del Alamo, Barcelona; Dr. Tiina Reilas, Ypäjä; Prof. Dr. Terttu Katila, Helsinki; Prof. Dr. Harald Sieme, Hannover). Die gewonnenen Serumproben wurden zur endokrinologischen Analyse (MTT Agrifood Research Finnland, Ypäjä; Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Leipzig) weitergeleitet und mittels RIA (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland) und mittels Enzymimmunoassay (Victor Multilabel Counter 1420, PerkinElmer, USA) bearbeitet.

Gruppe A: künstlich besamte Stuten

In Gruppe A standen 15 Tiere mit einem Alter von 4 bis 16 Jahren (Median 7 Jahre) zur Verfügung. Am 15. Tag nach der Ovulation erfolgte eine Trächtigkeitsuntersuchung. Bei einem Teil (n = 8) der künstlich besamten Stuten konnte ultrasonographisch ein Embryo nachgewiesen werden, diese Pferde wurden als „gravid“ eingestuft. Bei den übrigen Stuten (n = 7) konnte keine Trächtigkeit nachgewiesen werden, diese Tiere wurden als nicht tragend bzw. „zyklisch“ bezeichnet.

Gruppe B: Stuten mit intrauterinem Ball

Gruppe B bestand aus 15 Stuten mit einem Alter von 4 bis 17 Jahren (Median 9 Jahre). Bei dem verwendeten Ball handelte es sich um einen wassergefüllten, sterilen Ball aus Polypropylen mit einem Durchmesser von 20 mm und einem Gewicht von 3,6 g (Abb. 3.1). Der Ball wurde manuell an Tag 3 nach der Ovulation mittels Doppel-Handschuh Technik (PORTUS et al. 2005) in den Uterus der Tiere eingesetzt (Abb. 3.2). Dabei wird das distale Ende eines Rektalhandschuhs abgeschnitten, so dass eine Röhre entsteht. Der Untersucher trägt einen sterilen Handschuh, in dem sich der einzuführende Ball befindet. Die Röhre des Rektalhandschuhs wird über den Arm des Untersuchers gestreift. Beim Erreichen der Zervix wird die Hand aus der Röhre geführt und weiter in den Uterus vorgeführt. Diese Methode minimiert die intrauterine Kontamination.



Abb. 3.1: intrauteriner Ball



Abb. 3.2: Doppel-Handschuh Technik

An Tag 15 p. ov. wurde eine positive Wirkung der Bälle beim Vorliegen einer Verlängerung der lutealen Phase, durch Serumprogesteronwerte > 10 ng/ml und einem fehlenden endometrialen Ödem definiert. Stuten mit einer regulären lutealen Phase wiesen dagegen Progesteronwerte < 10 ng/ml und ein mittels Ultraschall darstellbares endometriales Ödem auf. Eine Rosseunterdrückung durch die Bälle konnte somit bei diesen Tieren nicht erreicht werden. Eine Zusammenfassung des Versuchsablaufs und des verwendeten Untersuchungsgutes unter Berücksichtigung des jeweiligen Untersuchungsziels gibt Abbildung 3.3 und Tab. 3.1 (S. 33).

3.3 Methoden

3.3.1 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Die Endometriumbioptate mit einer Größe von 20 x 4 x 3 mm wurden am 15. Tag nach der Ovulation unter rektaler Kontrolle mit einer scharfen 70-cm Alligator-Biospiezange (Pilling, Fort Washington, PA; Arnolds Veterinary, UK) entnommen und unmittelbar danach in 4 %igem Formalin fixiert. Anschließend wurde eine Einbettung der formalinfixierten Proben in Paraplast durchgeführt. Es erfolgte eine Versendung der Paraplastblöcke (Prof. Dr. Terttu Katila, Finnland) oder der formalinfixierten Proben (Prof. Dr. Harald Sieme, Hannover) an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig.

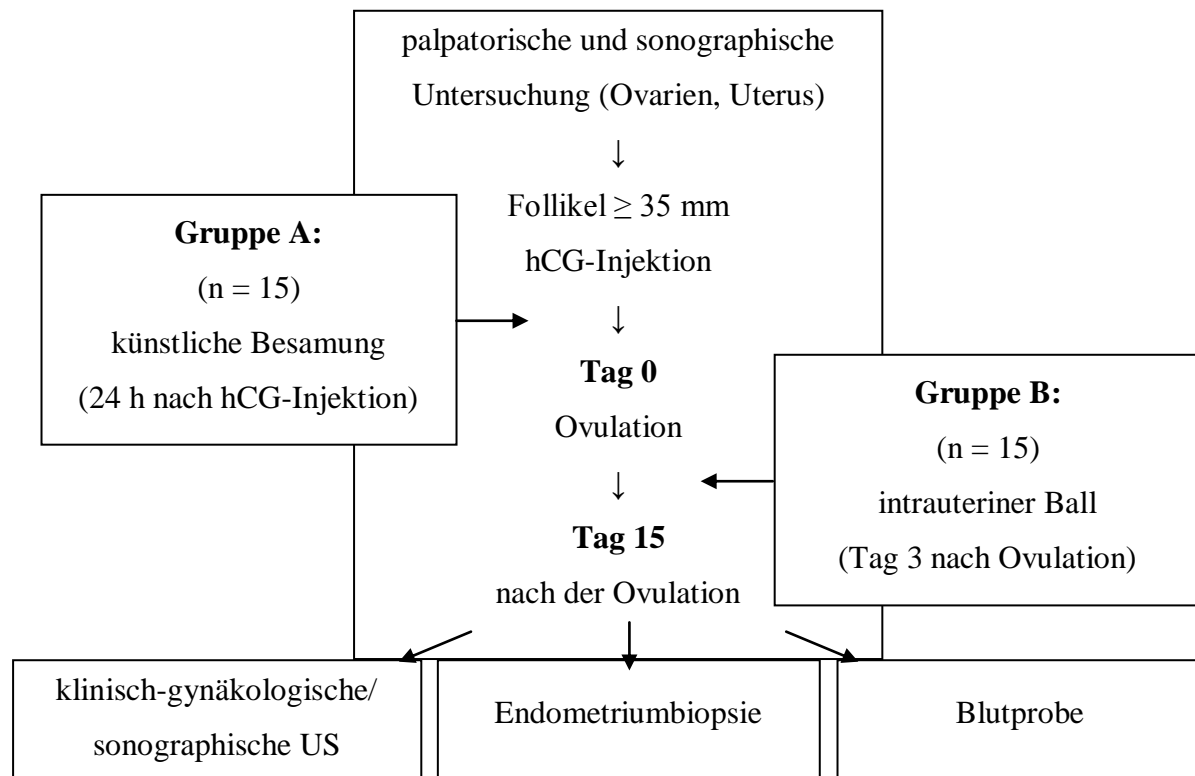


Abb. 3.3: Versuchsablauf

Tab. 3.1: Übersicht über das Tiergut und Versuchsablauf

Tiergut (n = 30)			
<u>Stuten der Gruppe A:</u> (n = 15) künstliche Besamung		<u>Stuten der Gruppe B:</u> (n = 15) intrauteriner Ball	
gravid	zyklisch	verlängerte Lutealphase	reguläre Lutealphase
Gruppe 1 (n = 8)	Gruppe 2 (n = 7)	Gruppe 3 (n = 7)	Gruppe 4 (n = 8)
Charakterisierung der histomorphologischen und immunhistologischen Befunde:			
- während der Gravidität und im Zyklusverlauf		- nach mechanischer endometrialer Stimulation durch den intrauterinen Ball	
→ vergleichende Betrachtung der erhobenen Befunde			
- Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der intrauterinen Bälle			
- Rückschlüsse auf das Signal der maternalen Trächtigkeitserkennung			

3.3.2 Anfertigung und Färbung der Schnitte

Von den Paraplastblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einer Hämalaun-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung; ROMEIS 2010) angefärbt. Die gesamte Auswertung (Histomorphologie, Immunhistologie) der Schnitte erfolgte als Blindstudie.

3.3.3 Lichtmikroskopische Auswertung und Kategorisierung

Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem Standardmikroskop der Fa. Olympus unter Verwendung von 10er, 20er und 40er Objektiven. Alle H.-E. gefärbten Präparate wurden auf ihre Auswertbarkeit überprüft und einer histomorphologischen Charakterisierung hinsichtlich der endometrialen Differenzierung und der histopathologisch nachweisbaren Alterationen (Endometrose, Endometritis, Angiosklerose) unterzogen sowie nachfolgend kategorisiert. Die Beurteilung der **Endometrose** berücksichtigte den Fibrosegrad (vgl. Tab. 3.2) nach KENNEY (1978) und den Aktivitätszustand (vgl. Tab. 3.3) der periglandulären Stromazellen nach den Kriterien von HOFFMANN (2006).

Tab. 3.2: Quantifizierung des Fibrosegrades nach KENNEY (1978)

Endometrosegrad	Anzahl der Bindegewebsschichten	Anzahl fibrotischer Herde*
geringgradig	1-3	≤2
mittelgradig	4-10	2-4
hochgradig	>10	≥4

*bezogen auf ein lineares Feld von 5,5 mm bei vier untersuchten Gesichtsfeldern

Der Aktivitätszustand wurde unterteilt in aktiv, inaktiv sowie überwiegend aktiv bzw. inaktiv und gemischt. Bei der aktiven Differenzierung weisen die Stromazellen eine ungeordnete periglanduläre Schichtung auf, besitzen einen großen, ovalen, hypochromatischen Zellkern und eine bauchige Form. Die an der inaktiven Endometrose beteiligten Stromazellen sind zwiebelschalenartig angeordnet und besitzen einen spindelförmigen, schmalen, hyperchromatischen Zellkern sowie eine langgestreckte Form. Der gemischte Endometrosetyp ist durch das Auftreten von 50 % aktiv und 50 % inaktiv differenzierten periglandulären Stromazellen gekennzeichnet.

Tab. 3.3: Aktivitätszustand der Endometrose nach HOFFMANN (2006)

Endometroseform	periglanduläre Stromazellen
aktive Fibrose	mindestens 75 % mit aktiver Differenzierung
inaktive Fibrose	mindestens 75 % mit inaktiver Differenzierung
gemischte Fibrose	50 % aktive und 50 % inaktive Differenzierung

Zusätzlich kann innerhalb der Fibrose eine örtlich begrenzte bis vollständige Destruktion des Drüsenepithels vorliegen und der Endometrose einen destruierenden Charakter verleihen.

Die Charakterisierung der **Endometritis** erfolgte zunächst mit Hilfe der H.-E.-Färbung in Bezug auf Charakter, Lokalisation (oberflächlich, tief), Verteilung, Alter (chronisch, akut) und Grad nach KENNEY (1978) und SCHOON et al. (1994). Hinsichtlich des Charakters wurde eine nicht-eitrige, eitrige und gemischtzellige Endometritis unterschieden. Eine Auszählung der freien Entzündungszellen erfolgte anschließend mittels Spezialverfahren (Immunhistologie, Spezialfärbungen) in allen Biopaten (vgl. Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Detaillierte Charakterisierung freier Zellen mittels Spezialverfahren

Zelltyp	Spezialverfahren
T-Lymphozyten	T-Zellmarker CD3 (Immunhistologie)
B-Lymphozyten	B-Zellmarker CD79A (Immunhistologie)
Plasmazellen	Unna-Pappenheim-Färbung (Methylgrün-Pyronin-Färbung)
Makrophagen	MAC 387, Lysoszym (Immunhistologie)
neutrophile Granulozyten	panoptische Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode)
eosinophile Granulozyten	panoptische Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode)
Mastzellen	panoptische Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode)

In Anlehnung an GRÜNINGER (1996) wurde die **Angiosklerose** als eine degenerative vasculäre Veränderung mit Zubildung kollagener und elastischer Fasern innerhalb der Gefäßwände definiert und eine Graduierung vorgenommen (vgl. Tab. 3.5). Die erhobenen Befunde der verschiedenen Gefäßtypen (venös/arteriell) wurden zu einer Diagnose zusammengefasst.

Tab. 3.5: Graduierung der Angiosklerose, modifiziert nach GRÜNINGER (1996)

Grad der Angiosklerose	Histomorphologische Charakteristika (Zubildung kollagener und elastischer Fasern)
unverändert	Normalstruktur
geringgradig	disseminierte, geringgradige oder in einer Lokalisation mittelgradige Zubildung
mittelgradig	disseminierte, mittelgradige oder in einer Lokalisation hochgradige Zubildung
hochgradig	in mehr als einer Lokalisation hochgradige Zubildung

Die **Kategorisierung** der Biopsien (vgl. Kap. 2.4.3, S. 20) erfolgte nach dem Schema von KENNEY und DOIG (1986), modifiziert nach SCHOON et al. (1992).

3.4 Histologische Spezialfärbungen

3.4.1 Unna-Pappenheim-Färbung (Methylgrün-Pyronin-Färbung) zur Identifizierung von Plasmazellen

Zur Darstellung von Plasmazellen wurden die Biopate mittels Unna-Pappenheim-Färbung (Methylgrün-Pyronin-Färbung, PALLASKE und SCHMIEDEL 1959) gefärbt. Durch das deutlich homogene, rötlich gefärbte Reaktionsprodukt im Zytoplasma und die blaugrünen Kerne bei gleichzeitigem Vorliegen einer entsprechenden Zellmorphologie lassen sich die als positiv zu beurteilenden Zellen eindeutig identifizieren (vgl. Abb. 3.4).

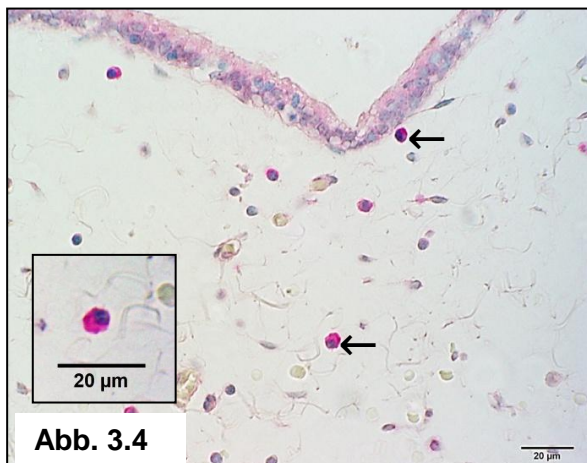


Abb. 3.4:
*Methylgrün-Pyronin-Färbung,
Endometrium mit Plasmazellen (←)*

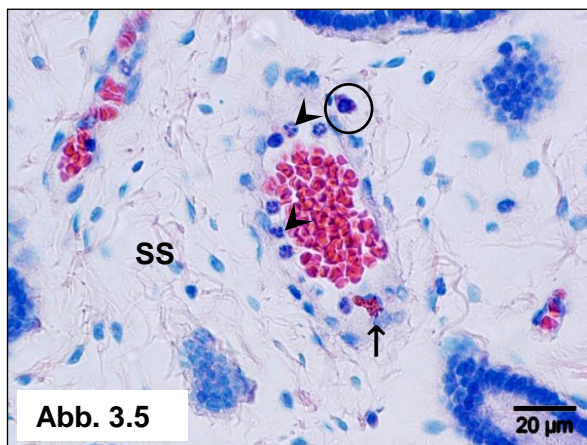


Abb. 3.5:
*May-Grünwald-Giemsa-Färbung,
Endometrium mit Mastzellen (o),
eosinophilen Granulozyten (↑) und neutro-
philen Granulozyten (Pfeilspitzen); Stratum
spongiosum (SS)*

3.4.2 Panoptische Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung) zur Identifizierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen

Zur Darstellung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen wurden die Biopate mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode, PALLASKE und SCHMIEDEL 1959) angefärbt. Neutrophile Granulozyten besitzen ein rosa gefärbtes, homogenes Zytoplasma. Eosinophile Granulozyten sind dagegen durch ein stark rot gefärbtes, feingranuläres Zytoplasma charakterisiert. Mastzellen weisen ein violette, feingranuläres Reaktionsprodukt im Zytoplasma auf (vgl. Abb. 3.5).

3.5 Immunhistologische Methoden

Vorversuche

Zunächst erfolgten zur Etablierung der Methodik Vorversuche für den Nachweis des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX2) im equinen Endometrium. Der verwendete Antikörper, die Vorbehandlungsverfahren und die Antikörperverdünnung mittels Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode wurden an ausgewählten Endometriumbiopsaten von graviden und zyklischen Stuten getestet und die optimale Antikörperverdünnung ausstitriert (vgl. Anhang, S. 123ff).

Hauptversuche

Die in dieser Studie durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mittels Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode. Alle Biopate wurden immunhistologisch auf das Vorkommen der sekretorischen endometrialen Proteine Uteroglobulin (UG), Uteroferrin (UF) und Uterokalin (UK) mittels polyklonaler Primärantikörper überprüft. Die Expression der Hormonrezeptoren ER (Östrogen-) und PR (Progesteron-Rezeptoren) sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen wurden mittels monoklonaler Primärantikörper untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression der COX2, einem Enzym der Prostaglandinsynthese, durch einen polyklonalen Primärantikörper immunhistologisch beurteilt. In einem weiteren Schritt wurden zur Identifizierung von Entzündungszellen die monoklonalen Primärantikörper CD 79A (B-Lymphozyten) und MAC 378 (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) sowie die polyklonalen Primärantikörper CD 3 (T-Lymphozyten) und Lysozym (Makrophagen, Granulozyten) verwendet. Die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen wird im Anhang detailliert beschrieben sowie die verwendeten Primärantikörper und ihre Bezugsquellen aufgeführt (vgl. Anhang, S. 123ff).

3.5.1 Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrollen wurden die in Tab. 9.3 (S. 125) genannten Gewebe des Pferdes mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten die jeweils mit den Kontrollseren (Kaninchenserum, T1) inkubierten Schnitte.

3.5.2 Auswertung der immunhistologischen Untersuchung

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune, feingranuläre Reaktionsprodukte bewertet, die in der Negativkontrolle nicht nachweisbar waren. Das eisenhaltige Pigment Hämosiderin, das in Folge des Blutabbaus in den Makrophagen und den Epithelzellen liegen kann, ist auch in der Negativkontrolle als hellbraunes, granuläres Material nachweisbar und kann somit von einer positiven immunhistologischen Reaktion eindeutig abgegrenzt werden. Ebenfalls als „negativ“ werden hellbraune, homogene, extrazelluläre Anfärbungen im Bereich entnahmebedingter Quetschartefakte und in den Arealen mit Plasma-insudation (Ödematisierung) in den Gewebeproben bewertet. Bei der Beurteilung der immunhistologischen Reaktionen wurden alle Zellpopulationen (luminales Epithel, glanduläres Epithel, Stromazellen, Blut- und Lymphgefäße, Entzündungszellen) des Endometriums sowie die Verteilung im Schnitt (diffus, multifokal, fokal/Stratum compactum, Stratum spongiosum)

berücksichtigt. Die Expression der verwendeten Marker in den entsprechenden Zellen kann eine intrazytoplasmatische (diffus, apikal akzentuiert, perinukleär, peripher), intranukleäre oder membranöse Verteilung aufweisen.

Die Bewertung der **Hormonrezeptor-Expression (ER/PR)** und der **COX2 Expression** erfolgte semiquantitativ anhand des modifizierten Immunreaktiven Scores (IRS) nach ÖZGEN et al. (1997), der einen Wert zwischen 0 und 10 annehmen kann unter Verwendung folgender Formel:

$$IRS = 1/100 \sum_{n=2}^4 \{PP_n \times \max [\varphi \times (SI_n - 1), 1]\}$$

Laufindex = n;
 Skalierungsfaktor $\varphi = 5$;
 Prozentsatz positiver Zellen = PP;
 Färbeintensität = SI

Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Färbeintensität semiquantitativ eingeschätzt (vgl. Tab. 3.6), in Prozentzahlen angegeben und in die Formel eingesetzt.

Tab. 3.6: Zuordnung von Färbeintensität und SI-Wert (IRS)

Laufindex (n)	Färbereaktion	SI-Wert	Legende zu Tab. 3.6: <i>SI-Wert: Färbeintensität;</i> <i>IRS: Immunreaktiver Score</i>
1	keine	0	
2	schwach	1	
3	mäßig	2	
4	stark	3	

Die Bewertung der **Proteinsekretion (UG, UF, UK)** erfolgte mittels des Sekretions-Scores (SSc; HOFFMANN et al. 2003, ELLENBERGER et al. 2008), wobei zusätzlich die Reaktionsintensität „angedeutet“ berücksichtigt und mit dem SI-Wert 0,5 versehen wurde (vgl. Tab. 3.7).

$$SSc = 1/100 \sum_{n=1}^5 (PP_n \times SI_n)$$

Laufindex = n
 Prozentsatz positiver Zellen = PP
 Färbeintensität = SI

Der Anteil der Zellen mit einer positiven Reaktion wurde im Verhältnis zur Gesamtzahl der jeweiligen Gewebestruktur geschätzt und in Prozentzahlen angegeben (PP). Weiter wurde die Färbeintensität (SI) beurteilt (vgl. Tab. 3.7). Der SSc kann, ebenso wie der IRS, Werte zwischen 0 (keine) und 10 (maximale immunhistologische Reaktion) annehmen.

Tab. 3.7: Zuordnung von Färbeintensität und SI-Wert (SSc)

Laufindex (n)	Färbereaktion	SI-Wert	Legende zu Tab. 3.7: <i>SI-Wert: Färbeintensität;</i> <i>SSc: Sekretionsscore</i>
1	keine	0	
2	angedeutet	0,5	
3	schwach	1	
4	mäßig	2	
5	stark	3	

Die Interpretation der graduellen Abweichungen des SSc in der Endometrose im Vergleich zum umliegenden unveränderten Gewebe erfolgte nach Tab. 3.8.

Tab. 3.8: *Graduelle Abweichung des Sekretionsscores (Ssc) in der Endometrose*

SSc	Symbol	Abweichung in der Expression
bis 0,2	=	kein Unterschied
über 0,2	↓ / ↑	vermindert / erhöht

Die Beurteilung der Expression von **Ki-67 Antigen** wurde semiquantitativ durchgeführt. Die Menge der positiven Zellen wurde geschätzt (keine: 0 %, wenige: 1-30 %, mäßig: 31-60 % und viele: > 61 %), dabei blieb die Intensität der Anfärbung unberücksichtigt.

Die Auswertung der **Entzündungszellmarker** erfolgte quantitativ. Bei jedem Biopat wurden in jeweils zehn direkt nebeneinander liegenden Feldern (HPF = High Power Field = Vergrößerung 40er Objektiv) die jeweiligen Zellen (T-/B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten) in den entsprechenden Schichten (luminale Epithel, Stratum compactum, Stratum spongiosum) gezählt. Dabei wurden pro Biopat 30 HPF ausgewertet, die sich in 10 HPF pro entsprechende Schicht aufteilten. Im Anschluss wurden die Entzündungszellen pro Schicht und Biopat addiert.

Bei einer vermehrten Infiltration von Entzündungszellen im Stratum compactum, die über das Maß der physiologischen zyklischen Selbstreinigung hinausgeht, wurde die Diagnose einer Endometritis gestellt. Für den Charakter wurden eosinophile Granulozyten und Mastzellen nicht berücksichtigt. Bei dem vermehrten Auftreten von mononukleären Zellen (T- /B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen) wurde eine chronisch nicht-eitrige Endometritis diagnostiziert, dominierten dagegen neutrophile Granulozyten eine akut eitrige Endometritis. Eine gemischtzellige Entzündung wurde lag vor, wenn beide Zellgruppen erhöht waren.

3.6 Statistische Untersuchung

Die statistische Untersuchung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 20 (SPSS Software-GmbH München) durchgeführt. Es wurde für die deskriptive Statistik der Median, das Maximum und das Minimum dargestellt sowie bei der quantitativen Auswertung der Entzündungszellen das 1. und 3. Quartil berechnet. Die statistische Untersuchung der Unterschiede in der Verteilung der Entzündungszellpopulationen in den jeweiligen Schichten erfolgte mittels dem Friedman-Test. Die Signifikanzprüfung zwischen den einzelnen Schichten wurde anhand des Wilcoxon Paarvergleichs durchgeführt, statistisch signifikant sind p-Werte $\leq 0,017$ (Bonferroni Adjustierung). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests (Globaltest) geprüft, statistisch signifikant sind p-Werte $\leq 0,05$. Im Falle eines signifikanten Kruskal-Wallis-Tests erfolgte im Anschluss die Signifikanzprüfung zwischen den einzelnen Datengruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) anhand des Mann-Whitney-U-Tests, statistisch signifikant sind p-Werte $\leq 0,0125$ (Bonferroni Adjustierung), statistisch auffällige Werte sind p-Werte $\leq 0,025$, solche sind mit einem Stern in Klammern (*) gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden teilweise in Tabellenform dargestellt. Die wichtigsten Befunde in den Tabellen sind grau hinterlegt.

4.1 Anamnestische Untersuchungsbefunde

4.1.1 Zusammensetzung der Gruppen

In Abhängigkeit von dem Ergebnis der ultrasonographischen Trächtigkeitsuntersuchung sowie der Progesteron- und Östradiolwerte im Serum an Tag 15 p.ov. (vgl. Tab. 4.1) werden die Stuten in 4 Gruppen eingeteilt (Kap. 3.1, S. 31ff). In Gruppe 1 (künstlich besamt/tragend) und 3 (IUD/verlängerte luteale Phase) ist das Verhältnis Progesteron (P) zu Östradiol (Ö) zugunsten von Progesteron verschoben (P-Dominanz), dagegen in Gruppe 2 (künstlich besamt/zyklisch) und 4 (IUD/reguläre luteale Phase) hin zu Östradiol (Ö-Dominanz).

Tab. 4.1: Progesteron (P) - und Östradiol (Ö) – Serumwerte an Tag 15 p.ov.

Gruppe	Stuten - ID	P (ng/ml)	Ö (pg/ml)	Gruppe	Stuten - ID	P (ng/ml)	Ö (pg/ml)
1. KB tragend	3	14,00	12,713	3. IUD vIP (P > 10 ng/ml)	1	fehlt	fehlt
	5	24,00	16,839		2	11,00	14,769
	8	31,00	18,863		13	23,00	12,687
	12	11,00	28,663		16	14,00	11,495
	20	12,00	17,658		19	12,00	17,000
	23	9,00	25,294		21	26,00	17,721
	24	18,00	12,215		28	18,00	11,878
	25	9,00	26,917		4	3,00	28,091
2. KB zyklisch (nicht- tragend)	10	2,00	25,567	4. IUD rIP (P < 10 ng/ml)	6	1,00	13,376
	11	fehlt	fehlt		9	1,00	12,604
	18	1,00	31,545		14	2,00	11,787
	27	14,00	22,199		15	5,00	17,889
	29	10,00	14,358		17	6,00	13,654
	242	14,70	38,20		22	1,00	24,177
	243	9,90	36,20		26	4,00	11,899

Legende zu Tab. 4.1: KB: künstlich besamt; vIP: verlängerte luteale Phase; rIP: reguläre luteale Phase; IUD: intrauterine device; Stuten ID: Stuten-Identifikationsnummer; p.ov.: post ovulationem; P: Serumprogesteronkonzentration; ng: Nanogramm; pg: Pikogramm; ml: Milliliter; fehlt: Probe nicht auswertbar

IUD-Stuten mit einer verlängerten lutealen Phase (Gruppe 3) zeigen in diesem Zusammenhang einen signifikant ($p = 0,001$) höheren Progesteronwert als Stuten mit regulärer lutealer Phase (Gruppe 4). Median sowie Maximum und Minimum der Progesteronwerte sind in der Abb. 4.1 graphisch dargestellt.

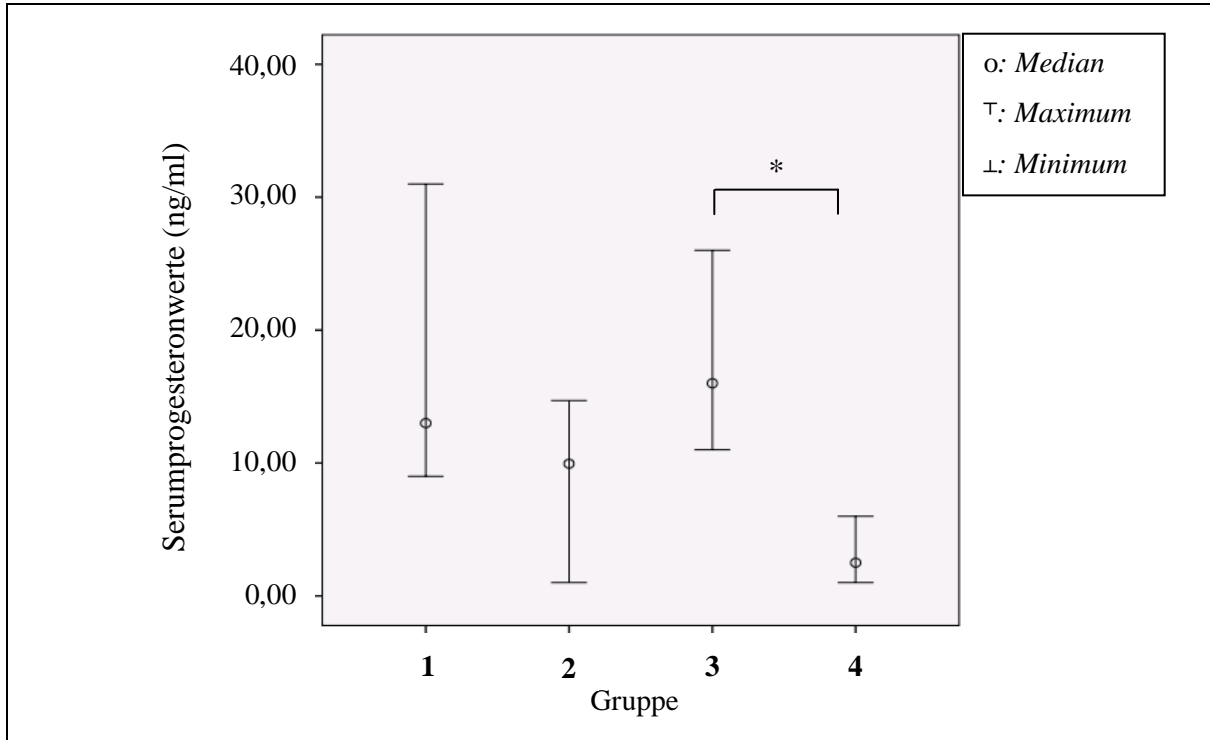


Abb. 4.1: Serumprogesteronwerte (ng/ml) der Versuchsgruppen

Legende zu Abb. 4.1: 1: künstlich besamt/tragend; 2: künstlich besamt/zyklisch (nicht-tragend); 3: IUD/vlP (verlängerte luteale Phase); 4: IUD/rIP (reguläre luteale Phase); IUD: intrauterine device; * statistisch signifikant ($p < 0,0125$; Mann-Whitney-U-Test); ng: Nanogramm; ml: Milliliter

4.1.2 Altersverteilung

Die Pferde weisen im Gruppenvergleich kein statistisch signifikant unterschiedliches Lebensalter auf. Jedoch sind die KB-Stuten/tragend (Gruppe 1) und die IUD-Stuten/vlP (Gruppe 3) jünger im Vergleich zu den Tieren der Gruppen 2 und 4 (vgl. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Altersverteilung der Stuten in Jahren

Alter in Jahren (Median)	Gruppe			
	1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vlP	4 IUD / rIP
	5,5	14	7	11

Legende zu Tab. 4.2: KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1

4.2 Histopathologische Untersuchungsbefunde am Endometrium

Die Auswertung der H.-E. gefärbten Biopate ($n = 30$) wird anhand des Bewertungsschemas nach KENNY und DOIG (1986), modifiziert nach SCHOON et al. (1992), vorgenommen (Kap. 3.3.3, S. 34). Die histopathologischen Befunde am Endometrium der einzelnen Stuten sind im Anhang (Tab. 9.1, S. 122; 9.2, S. 123) aufgeführt.

4.2.1 Prävalenz der Endometritis im Untersuchungsgut

Bei 20 % (6/30) der Pferde kann eine Endometritis diagnostiziert werden (vgl. Tab. 4.3). Drei der Stuten weisen eine eitrige Endometritis auf, davon ist eine aus der Gruppe 1 und zwei aus Gruppe 3 (vgl. Abb. 4.2 a). Eine chronisch nicht-eitrige Endometritis ist bei drei KB-Stuten nachweisbar (tragend: n = 1; nicht-tragend: n = 2; vgl. Tab. 4.3, Abb. 4.2 b). Die Tiere der Gruppe 4 zeigen keine entzündlichen Veränderungen. Eine Übersicht zu den im Endometrium auftretenden Entzündungszellpopulationen und ihrer Verteilung erfolgt in Kap. 4.7, S. 68ff.

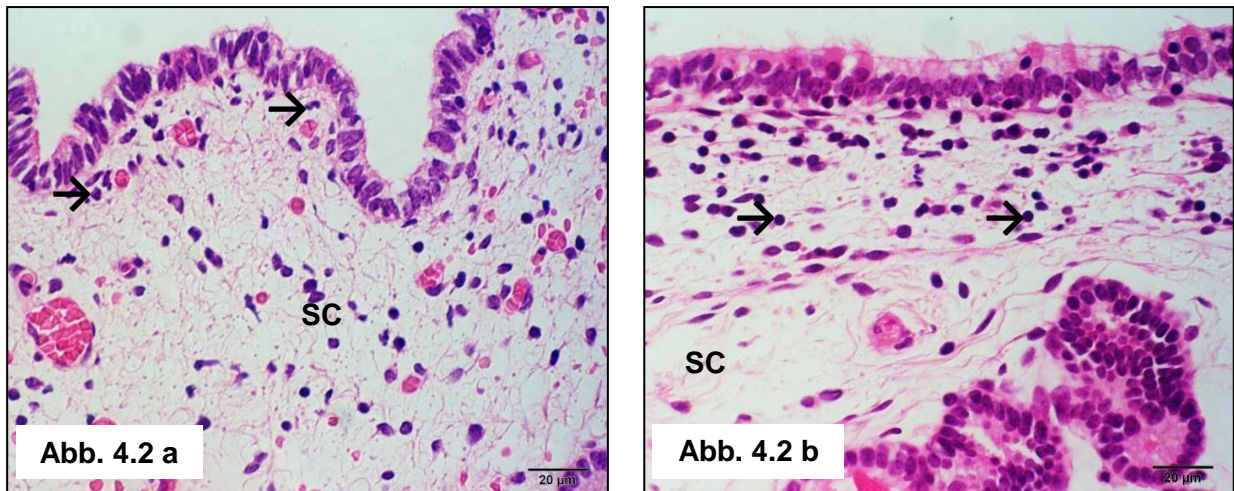


Abb. 4.2 a, b: Endometrium, H.-E.-Färbung

Im Endometrium der Stuten zeigt sich eine geringgradige oberflächliche Endometritis (Stratum compactum: SC), die hinsichtlich Charakter und Alter variiert:

a: akut, eitrig; Infiltration mit neutrophilen Granulozyten (Pfeile)

b: chronisch, nicht-eitrig; Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen (Pfeile)

Tab. 4.3: Stuten mit Endometritis

Endometritis (Anzahl)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		n = 2	n = 2	n = 2	n = 0
Gruppe	ID	Diagnose			
1 KB / tragend	12	geringgradige oberflächliche chronische nicht-eitrige Endometritis			
	24	geringgradige oberflächliche und tiefe akute eitrige Endometritis			
2 KB / zyklisch	11	geringgradige oberflächliche chronische nicht-eitrige Endometritis			
	29	geringgradige oberflächliche chronische nicht-eitrige Endometritis			
3 IUD / vIP	16	geringgradige tiefe akute eitrige Endometritis			
	21	geringgradige oberflächliche akute eitrige Endometritis			

Legende zu Tab. 4.3: ID: Identifikationsnummer, KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 40

4.2.2 Prävalenz der Endometrose im Untersuchungsgut

Insgesamt ist in 25 von 30 untersuchten Biopaten eine Endometrose nachweisbar (vgl. Tab. 4.4; Tab. 4.5, S. 44). Bei den Tieren der Gruppe 1 werden mehrheitlich (5/8 Stuten) geringgradige Endometrosen beobachtet. Dagegen zeigt sich bei den KB-Stuten/zyklisch überwiegend (4/7 Stuten) eine mittelgradige Endometrose (vgl. Abb. 4.3 a, b). Die IUD-Pferde weisen insgesamt eine heterogene Verteilung des Schweregrades auf (vgl. Tab. 4.4). Bei sieben Stuten kann eine destruierende Endometrose (vgl. Abb. 4.3 b) ermittelt werden, vier dieser Pferde sind in Gruppe 2 (KB/zyklisch), weitere zwei Tiere stammen aus der Gruppe 4 und bei einer handelt es sich um eine IUD-Stute mit vIP (Gruppe 3). Bezüglich der Endometroseform (aktiv, inaktiv, gemischt) zeigen sich keine Unterschiede (vgl. Tab 4.5, S. 44).

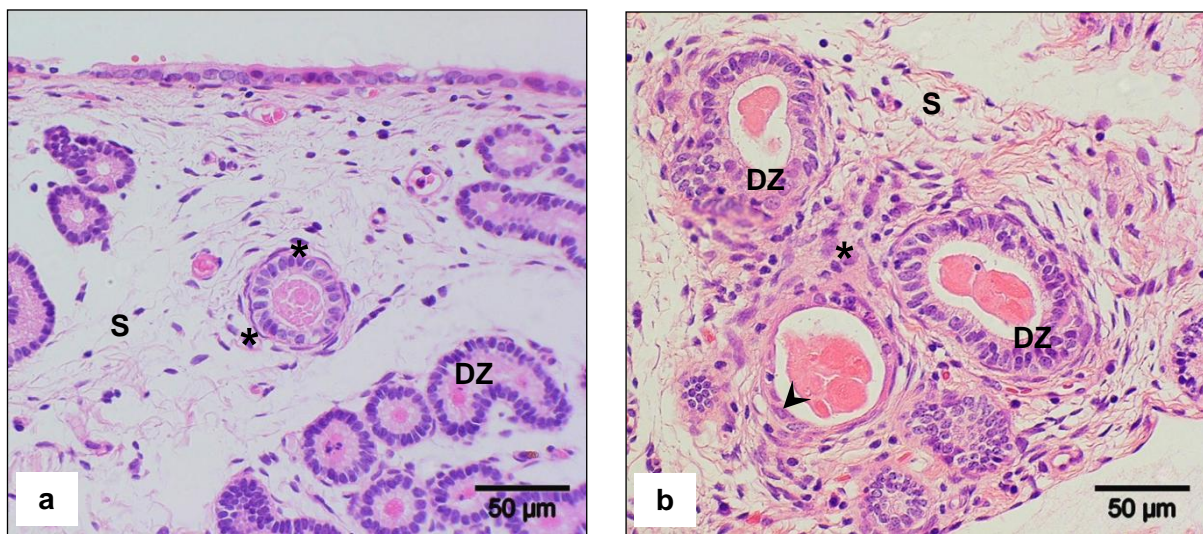


Abb. 4.3 a, b: Endometrium, H.E.-Färbung; Stroma (S); Drüsenzellen (DZ)

Im Endometrium der Stuten ist eine Endometrose mit Unterschieden bezüglich Grad und Form nachweisbar:

a: periglanduläre Fibrose (*), geringgradig, inaktiv, nicht-destruierend, Einzeldrüse

b: periglanduläre Fibrose (*), mittelgradig, aktiv, teils destruierend (Pfeilspitze), Drüsennest

Tab. 4.4: Verteilung von Grad und Form der Endometrose innerhalb der Gruppen

Endometrose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Grad	o.b.B.	3	1	1	1
	ggr	5	2	3	4
	mgr	0	4	3	2
	hgr	0	0	0	1
destruierend		0	4	1	2

Legende zu Tab. 4.4: o.b.B.: ohne besonderen Befund; ggr: geringgradig; mgr: mittelgradig; hgr: hochgradig; KB: künstlich besamt; Gruppeneinteilung vergleiche Abb. 4.1, S. 41

Tab. 4.5: Verteilung der Endometrose-Form innerhalb der Gruppen

Endometrose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Form	aktiv	1	4	3	4
	inaktiv	3	1	1	1
	gemischt	1	1	2	2

Legende zu Tab. 4.5: KB: künstlich besamt; Gruppeneinteilung vergleiche Abb. 4.1, S. 41

4.2.3 Prävalenz der Angiosklerose im Untersuchungsgut

Die Angiosklerose ist ein häufiger (22/30 Stuten) Befund im eigenen Tiergut (vgl. Tab. 4.6). Bei den KB-Stuten/tragend (Gruppe 1) und den IUD-Stuten/vIP (Gruppe 3) zeigen die Gefäße keine oder lediglich geringe Veränderungen. Dagegen sind bei den Tieren der Gruppe 2 und 4 auch mittelgradige Alterationen nachweisbar (vgl. Abb. 4.4 a, b).

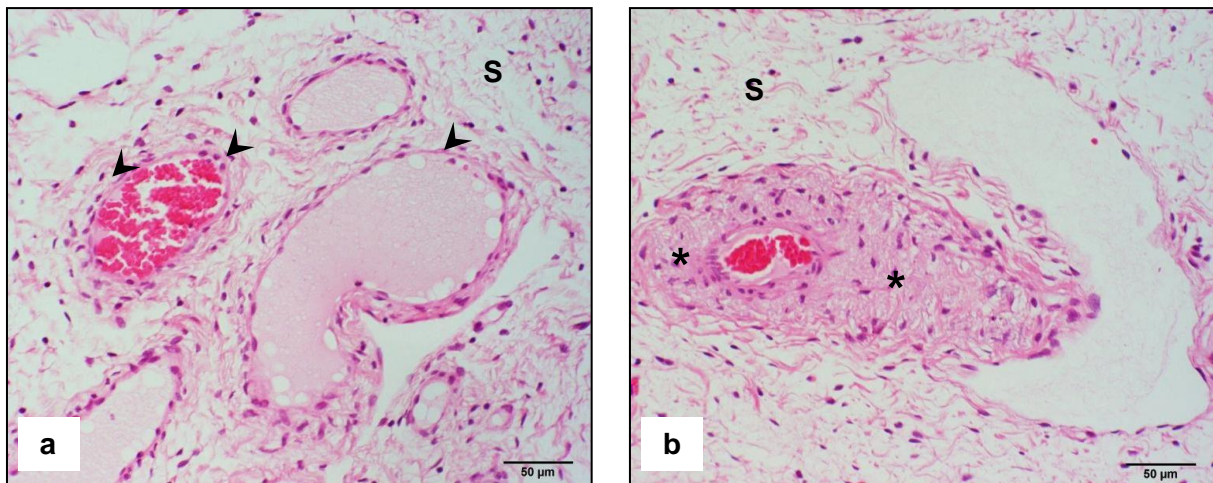


Abb. 4.4 a, b: Blutgefäße des Stromas (S); H.-E.-Färbung

a: venöse und arterielle Gefäße ohne besonderen Befund (Pfeilspitzen)

b: mittelgradige Angiosklerose eines kleinen arteriellen Gefäßes (*)

Tab. 4.6: Verteilung des Schweregrades der Angiosklerose innerhalb der Gruppen

Angiosklerose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Grad	o.b.B.	5	2	1	0
	ggr	3	2	6	5
	mgr	0	3	0	3
	hgr	0	0	0	0

Legende zu Tab. 4.6: vergleiche Abb. 4.1, S. 41 und Tab. 4.4, S. 43

4.2.4 Kategorisierung

Im Anschluss an die histopathologische Befunderhebung erfolgte die Kategorisierung (vgl. Kap. 2.4.3, S. 20f) nach KENNEY und DOIG (1986), modifiziert nach SCHOON et al. (1992). Die graviden Tiere (Gruppe 1) gehören der Kategorie I/II a ($n = 8$, vgl. Tab. 4.7) an, dagegen zählen die KB-Stuten/zyklisch (Gruppe 2) häufiger zu den Kategorien II b/III ($n = 5$, vgl. Tab. 4.7). Es fällt auf, dass die tragenden Pferde in eine bessere Kategorie eingeordnet werden im Vergleich zu den nicht-tragenden KB-Stuten. Die IUD-Tiere der Gruppe 3 und 4 (vgl. Tab. 4.7) zeigen eine heterogene Verteilung der Klassifizierung (Kat. I - III).

Die Länge der Güstzeit ist unbekannt und kann somit nicht bei der Kategorisierung berücksichtigt werden.

Tab. 4.7: Verteilung der Kategorie innerhalb der Stutengruppen

Kategorie	Gruppe							
	1 KB / tragend		2 KB / zyklisch		3 IUD / vIP		4 IUD / rIP	
	Anzahl		Anzahl		Anzahl		Anzahl	
I	8	1	2	0	4	1	4	1
II a		7		2		3		3
II b	0	0	5	4	3	1	4	3
III		0		1		2		1

Legende zu Tab. 4.7: KB: künstlich besamt; Gruppeneinteilung vergleiche Abb. 4.1, S. 41

4.3 Immunhistologische Untersuchungen der Cyclooxygenase 2

An allen Biopтатаen erfolgte ein immunhistologischer Nachweis des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX2). Das luminale Epithel (LE), die Epithelzellen der Ausführungsgänge (AS) und die apikalen Drüsenzellen (aDr) exprimieren das Enzym COX2 intrazytoplasmatisch und perinukleär akzentuiert (vgl. Abb. 4.6, S. 47). Dabei kann in allen Biopтатаen eine Abnahme der Expression von dem luminalen Epithel (Median IRS: 1,5) über die Zellen der Ausführungsgänge (Median IRS: 0,1) zu den apikalen Drüsenzellen (Median IRS: 0,05) beobachtet werden. Die epithelialen Zellen der mittleren und basalen Drüsen zeigen keine COX2-Expression. Die drei Zellpopulationen (LE, AS, aDr) werden aufgrund der nur geringen Unterschiede des Immunreaktiven Scores (IRS) zu einem Mittelwert ($\text{IRS LE} + \text{IRS AS} + \text{IRS aDr} / 3$) für das Gesamtbiopstat zusammengefasst. Gruppenspezifische Veränderungen in der Expression werden mit dem Gesamtscore (IRS) dargestellt (vgl. Abb. 4.5).

Die **Prozentsätze** der positiv mit dem Antikörper reagierenden immunhistologisch untersuchten Zellen variieren und werden in Tabellenform dargestellt (vgl. Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Gruppenspezifischer Prozentsatz COX2-exprimierender Zellen (PP)

COX2		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
Gesamt	PP %	0 - 10	20 - 100	20 - 100	30 - 100

Legende zu Tab. 4.8: PP: Prozentsatz positiver Zellen; COX2: Cyclooxygenase 2; vgl. Abb. 4.1, S. 41

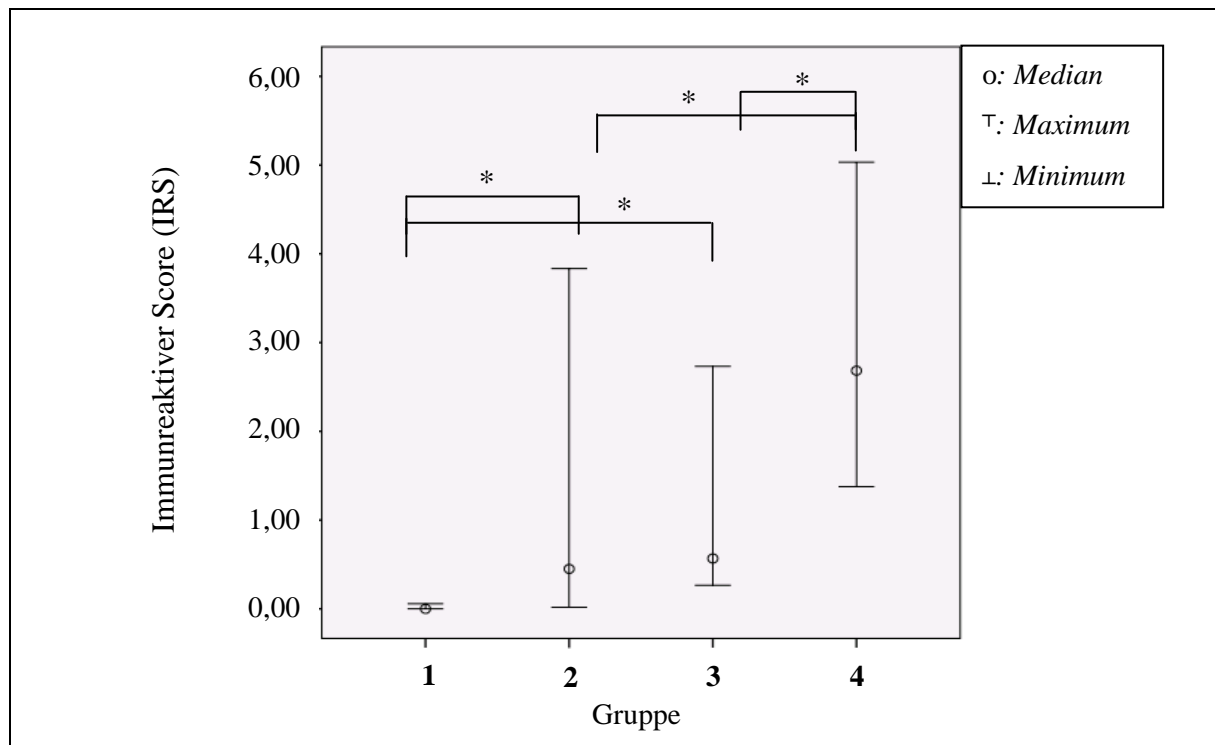


Abb. 4.5: COX-2-Expression der Versuchsgruppen

Legende zu Abb. 4.5: COX-2: Cyclooxygenase 2, vergleiche Abb. 4.1, S. 41

4.3.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Die vergleichende Betrachtung zeigt **statistisch signifikante** Unterschiede zwischen allen Gruppen (vgl. Abb. 4.5, S. 46). Dabei weisen die graviden Tiere (Gruppe 1) teils keine COX2-Expression oder lediglich niedrige IRS-Werte (IRS Median: 0,00) auf. Dagegen zeigen die IUD-Stuten mit einer regulären Lutealphase (Gruppe 4) die höchste Expression (IRS Median: 2,68) von COX2. Die IRS-Werte der Gruppe 2 (IRS Median: 0,45) und 3 (IRS Median: 0,57) liegen auf einem vergleichbaren Niveau mit einer überwiegend (12/14 Stuten) angedeuteten bis geringgradigen COX2-Expression. Diese Werte liegen über der COX2-Konzentration der graviden Stuten (Gruppe 1) und unter der deutlichen Expression der Gruppe 4 (IUD/rIP; vgl. Abb. 4.5, S. 46; Abb. 4.6 a – d).

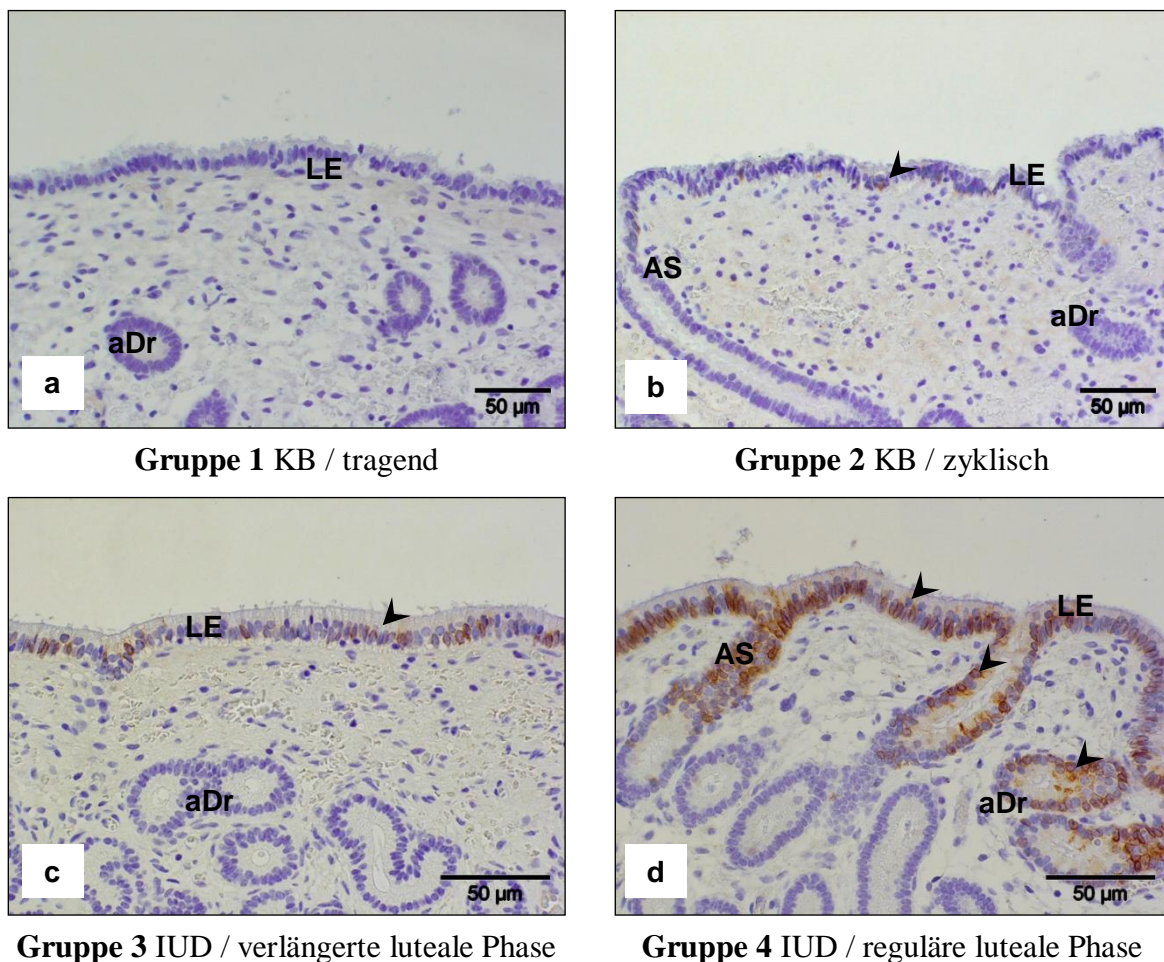


Abb. 4.6 a-d:

Endometrium, Immunhistologie, Cyclooxygenase 2 (COX2)-Expression (Pfeilspitzen)

Die intensivste (mittelgradige) COX2-Expression ist im luminalen Epithel (LE), den Zellen der Ausführungsgänge (AS) und den apikalen Drüsen (aDr) der Gruppe 4 (d) nachweisbar. Dagegen zeigen einzelne Zellen des luminalen Epithels (LE) der Gruppe 3 eine geringgradige (c) sowie der Gruppe 2 eine lediglich angedeutete (b) COX2-Expression. In den Epithelzellen der Gruppe 1 ist eine COX2-Expression nicht feststellbar (a); *KB: künstlich besamt, IUD: intrauterine device*

4.4 Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis der endometrial synthetisierten Proteine

An allen Biopstaten der vier Gruppen erfolgte der immunhistologische Nachweis von Uteroferrin (UF), Uterokalin (UK) und Uteroglobulin (UG). Es werden die gruppenspezifischen Veränderungen in der Expression gezeigt. Der Sekretionsscore (SSc) des luminalen Epithels und der Ausführungsgänge (LE+AS), der apikalen, mittleren und basalen Uterindrüsen (aDr, mDr, bDr) werden gesondert dargestellt sowie der Sekretions-Gesamtscore. Der Gesamtscore bildet den Mittelwert aus den einzelnen Abschnitten $[Ssc (LE+AS) + Ssc aDr + Ssc mDr + Ssc bDr / 4]$. Die Epithelzellen der genannten Strukturen (LE+AS, Drüsen) exprimieren die untersuchten Proteine intrazytoplasmatisch diffus und zum Teil apikal akzentuiert. Zusätzlich befindet sich positiv mit den Antikörpern reagierendes Material innerhalb der Drüsenlumina.

Die **Prozentsätze** der positiv mit dem Antikörper reagierenden immunhistologisch untersuchten Zellen variieren und werden in Tabellenform dargestellt (Tab. 4.9, S. 50; Tab. 4.11, S. 55; Tab. 4.13, S. 59).

4.4.1 Uteroferrin (UF)

In allen Proben wird Uteroferrin vorwiegend in den apikalen Drüsenzellen (aDr) nachgewiesen, wobei die Expression geringgradig bis mittelgradig (Ssc 0,65 bis 5,15) ausgeprägt ist. Zu den basalen Drüsenzellen (Ssc 0,05 bis 2,60) nimmt die Expression ab. Ein geringer Nachweis wird in den Zellen des LE+AS beobachtet (Ssc 0,10 bis 2,30; vgl. Abb. 4.7).

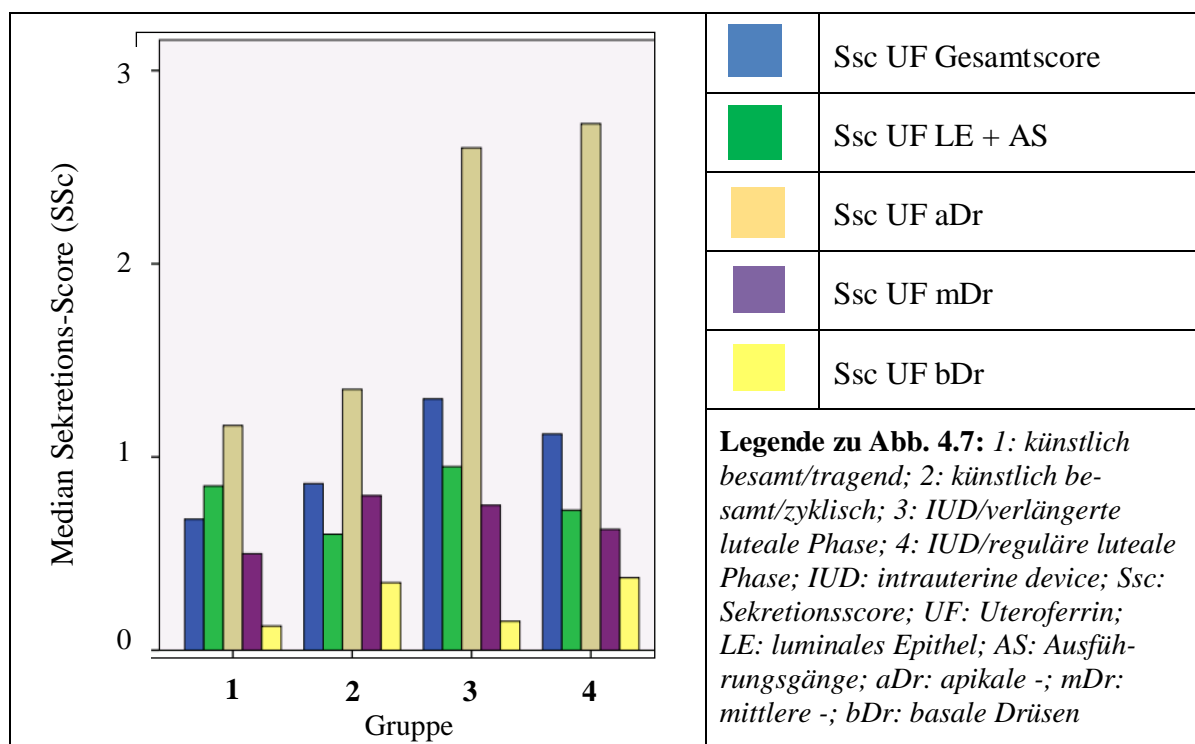


Abb. 4.7: Gruppenspezifischer Median des Sekretions-Scores der Uteroferrin-exprimierenden Zellen

4.4.1.1 Uteroferrin-Expression im luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge

Das lumenale Epithel und die Zellen der Ausführungsgänge (Ssc 0,10 bis 2,30) sind in den vier Gruppen durch eine angedeutete bis geringgradige UF-Expression gekennzeichnet.

4.4.1.2 Uteroferrin-Expression in den Drüsenzellen

Apikale Drüsen (aDr)

Die apikalen Drüsenzellen der KB-Stuten der Gruppe 1 (Ssc 0,65 bis 2,50) und 2 (Ssc 0,80 bis 3,35) weisen eine überwiegend (10/15 Stuten) geringgradige UF-Expression auf. Dagegen sind die Epithelzellen der apikalen Drüsen der IUD-Stuten aus Gruppe 3 (Ssc 0,85 bis 5,15) und 4 (Ssc 0,65 bis 4,00) durch eine geringgradige bis mittelgradige UF-Expression gekennzeichnet (vgl. Abb. 4.8). Der Unterschied zwischen den KB-Stuten der Gruppe 1 und den IUD-Stuten der Gruppe 3 ist statistisch auffällig, die IUD/vIP-Stuten zeigen in diesem Vergleich eine erhöhte Sekretion.

Mittlere Drüsen (mDr)

Eine überwiegend (6/8 Stuten) angedeutete UF-Expression ist in den mittleren Drüsenzellen der KB-Stuten/tragend (Gruppe 1) nachweisbar (Ssc 0,20 bis 0,80). Die Epithelzellen der mDr bei den verbleibenden Gruppen weisen eine vorwiegend (13/22 Stuten) geringgradige Expression auf (Ssc 0,15 bis 3,40). Zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) sind keine statistischen Differenzen zu ermitteln (vgl. Abb. 4.7, S. 48).

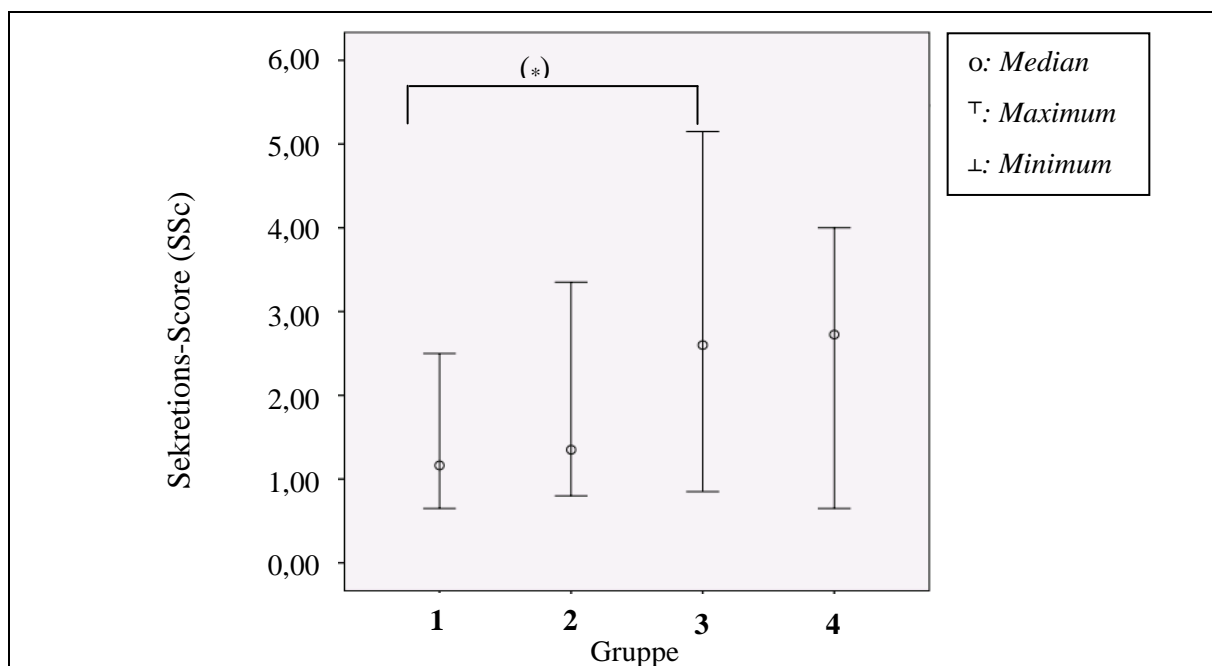


Abb. 4.8: Uteroferrin-Expression der apikalen Drüsenzellen der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.8: (*): statistisch auffällig ($0,0125 < p < 0,025$; Mann-Whitney-U-Test), vergleiche Abb. 4.1, S. 41

Basale Drüsen (bDr)

Bei den basalen Drüsen nimmt die Expressionsintensität und die Anzahl der UF-exprimierenden Zellen und somit der Ssc weiter ab. Die Drüsenzellen sind dabei gruppenunabhängig bei allen Stuten größtenteils (28/30 Stuten) lediglich durch eine angedeutete Expressionsintensität gekennzeichnet. In der statistischen Auswertung sind somit keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln, allerdings sind zwischen den Gruppen Abstufungen erkennbar (vgl. Abb. 4.7, S. 48). Die UF-Expression der basalen Drüsenzellen der Gruppe 1 (Ssc 0,10 bis 0,35) gleicht weitestgehend der UF-Expression der Gruppe 3 (Ssc 0,05 bis 0,50). Dagegen sind die bDr der Gruppe 2 (Ssc 0,10 bis 0,95) im Vergleich zur Gruppe 1 sowie die entsprechenden Zellen der Gruppe 4 (Ssc 0,15 bis 2,60) im Vergleich zur Gruppe 3 durch eine dezent erhöhte UF-Expression gekennzeichnet (vgl. Abb 4.7, S. 48).

4.4.1.3 Gesamtscore der Uteroferrin-Expression

Insgesamt zeigen die Zellen der tragenden Stuten aus Gruppe 1 eine angedeutete bis geringgradige UF-Expression mit einem Ssc von 0,35 bis 1,03. Dagegen ist die UF-Expression der Zellen in den weiteren Stutengruppen überwiegend (21/22 Stuten) geringgradig (Ssc 0,51 bis 2,60), so dass zwischen diesen Gruppen (2/4; 3/4) keine Differenzen zu ermitteln sind (vgl. Abb. 4.9, S. 51). Allerdings zeigen sich zwischen Gruppe 1 und 3 statistisch signifikante Unterschiede. Die IUD-Stuten/vlP (Gruppe 3) weisen dabei einen höheren Gesamtscore auf. Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 ist dagegen nicht statistisch signifikant.

Tab. 4.9: Gruppenspezifischer Prozentsatz Uteroferrin-exprimierender Zellen (PP)

Uteroferrin		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vlP	4 IUD / rlP
apikale Drüsen	PP (%)	100	90 - 100	100	100
mittlere Drüsen	PP (%)	40 - 100	90 - 100	30 - 100	50 - 100
basale Drüsen	PP (%)	20 - 70	20 - 100	20 - 90	30 - 100
Gesamt	PP (%)	20 - 100	20 - 100	20 - 100	30 - 100
LE+AS	PP (%)	45 - 100	20 - 95	30 - 100	60 - 90

Legende zu Tab. 4.9: KB: künstlich besamt; IUD: intrauterine device; vlP: verlängerte luteale Phase; rlP: reguläre luteale Phase; PP: Prozentsatz positiver Zellen

4.4.1.4 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Die IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) zeigen im Vergleich zu den KB-Stuten (Gruppe 1 und 2) im Bezug auf den Gesamtscore und im Bereich der apikalen Drüsen eine erhöhte UF-Expression, dabei ist der Unterschied des Gesamtscores zwischen der Gruppe 1 und Gruppe 3 **statistisch signifikant** (vgl. Abb. 4.9, S. 51; Abb. 4.10, S. 52), während sich bei den apikalen Drüsen (vgl. Abb. 4.8, S. 49) **statistisch auffällige** Differenzen nachweisen lassen. In Bezug auf die basalen Drüsenepithelzellen sind lediglich **Abstufungen** erkennbar, es zeigt sich eine schwache Expression bei den Stuten der Gruppe 1 und 3 und im Vergleich eine dezent erhöhte UF-Expression (vgl. Abb. 4.7, S. 48) bei den Stuten der Gruppe 2 (vgl. 1/2) und 4 (vgl. 3/4). Im Bereich des luminalen Epithels und der Ausführungsgänge sowie der mittleren Drüsen sind **keine Unterschiede** zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) erkennbar (graphisch nicht dargestellt).

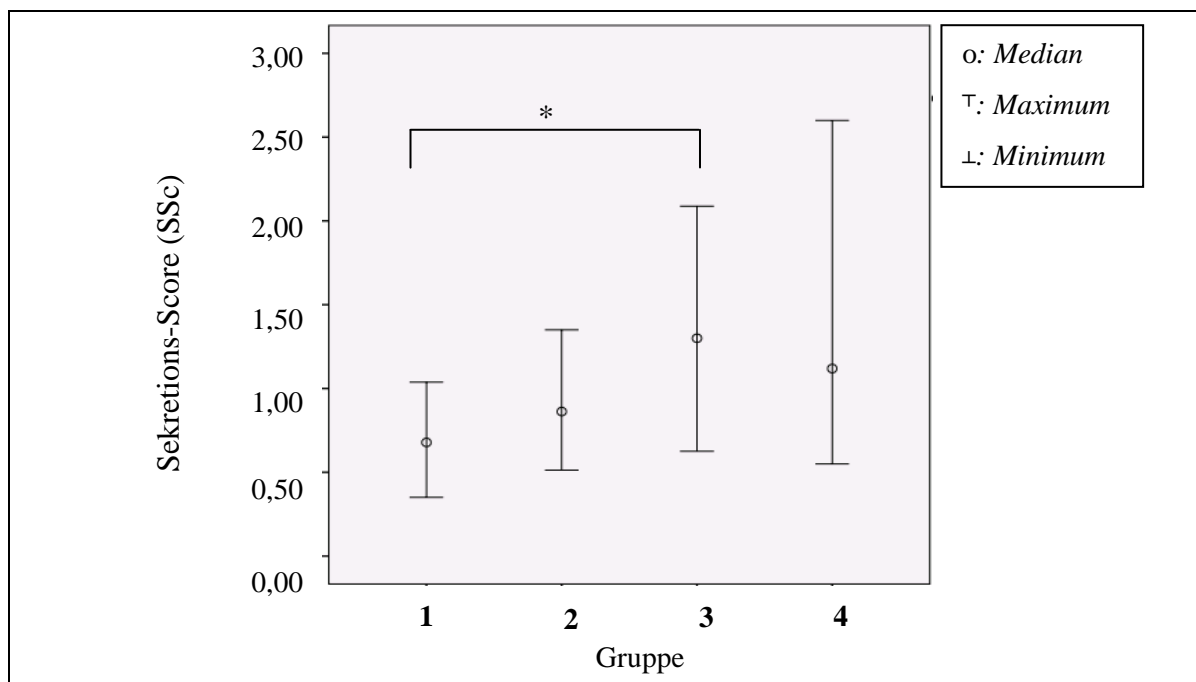


Abb. 4.9: Uteroferrin-Expression (Gesamtscore) der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.9: vergleiche Abb. 4.1, S. 41

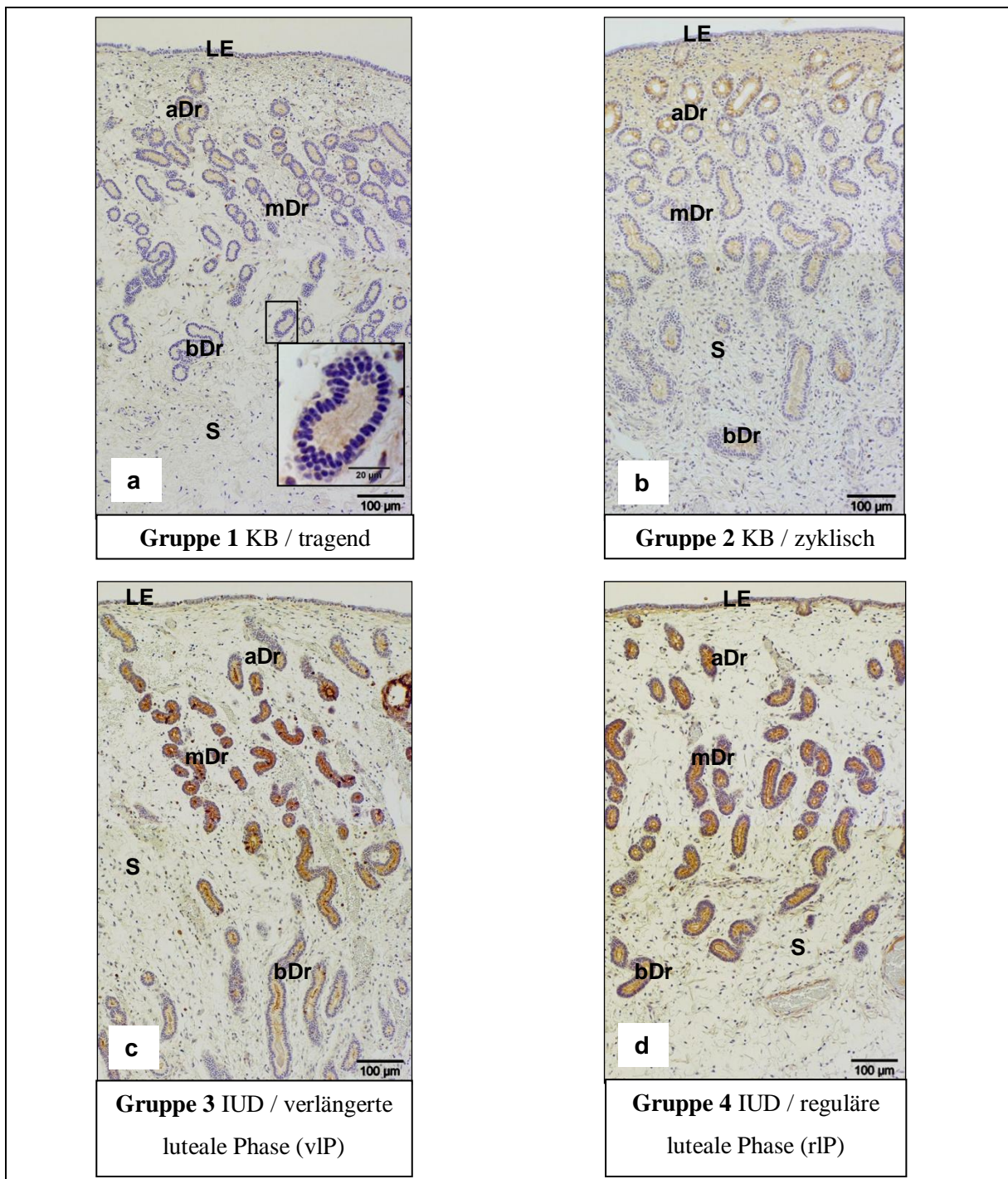


Abb. 4.10 a-d: Endometrium, Immunhistologie, Uteroferrin (UF)-Expression

Alle apikalen (aDr), mittleren (mDr) und basalen (bDr) Drüsenzellen zeigen, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, eine variable UF-Expression: Im Vergleich zu den KB-Stuten (a, b; geringgradig) zeigen die IUD-Stuten (c, d) eine deutliche (mittelgradige) UF-Expression in den oberen Drüsenzellen (aDr, mDr). Während die basalen Drüsenzellen (bDr) der Gruppe 1 (a) und 3 (c) durch einen angedeutete UF-Nachweis gekennzeichnet sind, zeigen diese Zellen bei den Stuten der Gruppe 2 (b) eine geringgradige, bei den Stuten der Gruppe 4 (d) eine mittelgradige Expression; luminales Epithel (LE), Stroma (S)

4.4.1.5 Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose

Die UF-Expression zeigt innerhalb der Endometrose im Vergleich zu den unveränderten umliegenden Drüsenepithelien ein zyklussynchrones ($n = 9$) sowie teils ein zyklusasynchrones Erscheinungsbild. Letzteres äußert sich überwiegend in einer Konzentrationsabnahme ($n = 14$) gegenüber dem intakten Endometrium, seltener ist eine geringgradig verstärkte Expression ($n = 1$) in den fibrotischen Herden im Vergleich zu den unveränderten Drüsenepithelien (vgl. Tab. 4.10, Abb. 4.11) nachweisbar.

Tab. 4.10: *Graduelle Abweichung der Uteroferrin-Expression in der Endometrose zum unveränderten Endometrium*

UF-Expression Endometrose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
vermindert ↓	$n = 14$	1	4	4	5
gleich =	$n = 9$	3	2	2	2
erhöht ↑	$n = 1$	1	1	0	0

Legende zu Tab. 4.10: n : Anzahl, KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

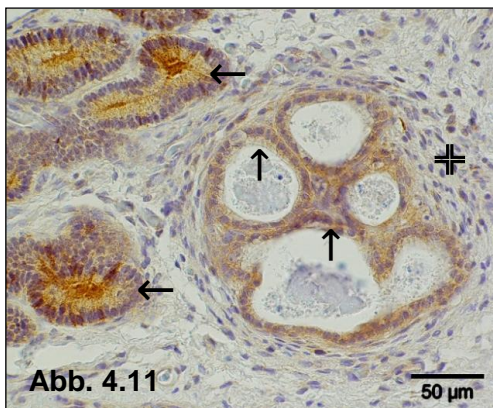


Abb. 4.11:

Endometrium, Immunhistologie, Uteroferrin (UF)-Expression

Die UF-Expression der unveränderten Drüsenzellen (←) ist mittelgradig ausgeprägt.

Im Vergleich dazu zeigen die Drüsenzellen (↑) innerhalb der Endometrose (⦿) eine schwächere UF-Expression.

4.4.2 Uterokalin (UK)

Vorwiegend wird Uterokalin gruppenunabhängig in den mittleren (Ssc 0,80 bis 6,00) und basalen (Ssc 0,80 bis 8,00) Drüsenzellen nachgewiesen, die Expressionsintensität ist dabei überwiegend geringgradig bis mittelgradig ausgeprägt. Im luminalen Epithel und den Ausführungsgängen (Ssc 0,01 bis 4,40) sowie den apikalen Drüsenzellen (Ssc 0,40 bis 4,23) sind die Ssc-Werte niedriger (vgl. Abb. 4.12, S. 54). Die Stuten Nr. 13 (Gruppe 3) und Nr. 22 (Gruppe 4) zeigen eine hochgradige UK-Expression in allen Zellen (Ssc Gesamtscore: 8,50/8,30, LE+AS: 6,50/5,70, aDr: 8,00/8,50, mDr: 9,50/9,50, bDr: 10,00/9,50).

4.4.2.1 Uterokalin-Expression im luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge

Im luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge ist in allen Gruppen eine vorwiegend (27/30 Stuten) geringgradige UK-Expression nachweisbar. Dabei weisen die Zellen der

KB-Stuten der Gruppe 2 (Ssc 0,01 bis 3,80) und die der IUD-Stuten der Gruppe 3 (Ssc 0,25 bis 1,50) niedrige Werte auf, während die Zellen der KB-Stuten der Gruppe 1 (Ssc 0,13 bis 1,95) und die der IUD-Tiere der Gruppe 4 (Ssc 0,25 bis 4,40) im Vergleich höhere Werte zeigen (vgl. Abb. 4.12). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) ergeben sich jedoch nicht.

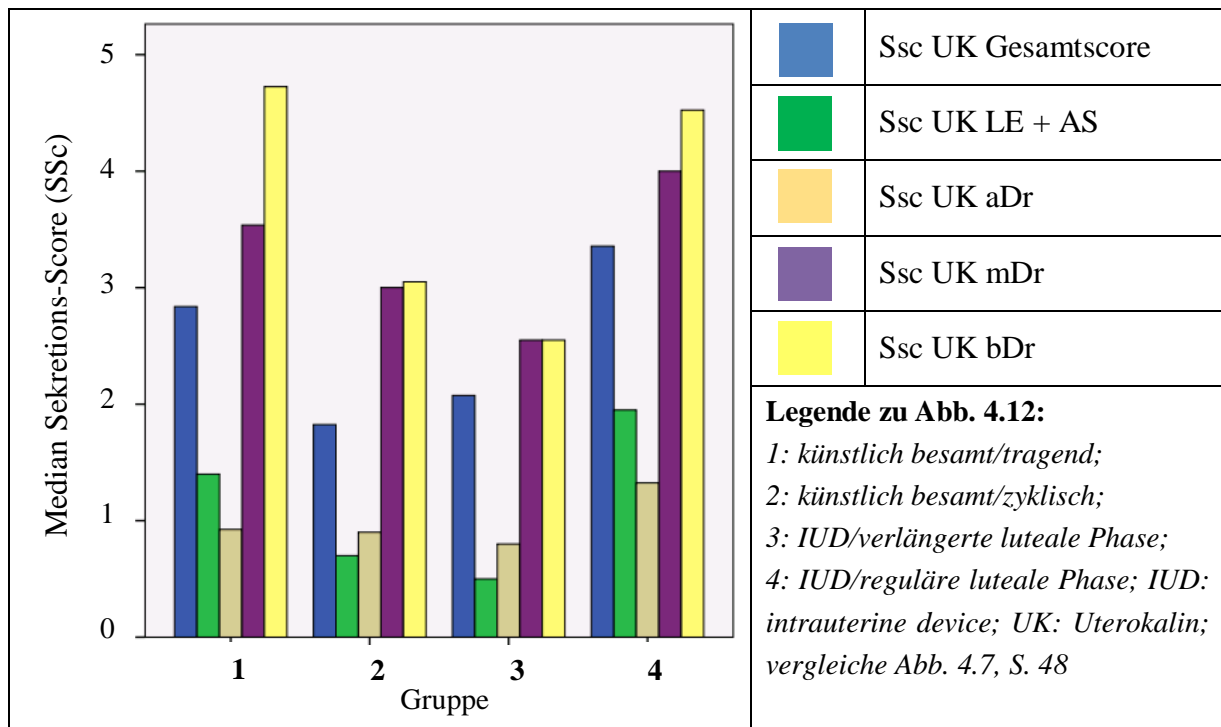


Abb. 4.12: Gruppenspezifischer Median des Sekretions-Scores der Uterokalin (UK)-exprimierenden Zellen

4.4.2.2 Uterokalin-Expression in den Drüsenzellen

Apikale Drüsen (aDr)

In allen Gruppen weisen die apikalen Drüsenzellen (Ssc 0,06 bis 4,23) eine mehrheitlich (24/30 Stuten) geringgradige UK-Expression auf. Die UK-Expression in den Zellen der Gruppe 3 (Ssc 0,70 bis 1,70) verhält sich nahezu wie die UK-Expression der Zellen in der Gruppe 2 (Ssc 0,40 bis 1,30). Dagegen zeigen die aDr der Gruppe 1 (Ssc 0,60 bis 4,23) und der Gruppe 4 (Ssc 0,65 bis 4,20) im Vergleich zu den Gruppen 2 und 3 eine dezent erhöhte UK-Expression (vgl. Abb. 4.12, S. 54). Diese Abstufungen zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) erweisen sich jedoch in der statistischen Auswertung als nicht signifikant.

Mittlere Drüsen (mDr)

Gruppenunabhängig zeigen die mittleren Drüsenzellen (Ssc 0,90 bis 6,00) eine gering- bis mittelgradige UK-Expression. In den Zellen der Gruppe 1 (Ssc 0,90 bis 6,00) und 4 (Ssc 0,80 bis 5,00) liegt eine höhere Proteinexpression vor als in den Zellen der Gruppen 2 (Ssc 0,85 bis 4,65) und 3 (Ssc 0,80 bis 3,40). Die Unterschiede lassen sich statistisch jedoch nicht absichern (vgl. Abb. 4.12, S. 54).

Basale Drüsen (bDr)

Die basalen Drüsenzellen der graviden Tiere (Gruppe 1: Ssc 1,80 bis 8,00) sind durch eine gering- bis mittelgradige UK-Expression gekennzeichnet und erreichen im Gruppenvergleich (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) die höchsten Ssc-Werte. Ähnliche Befunde weisen die bDr der KB-Stuten/zyklisch (Gruppe 2: Ssc 0,80 bis 5,10) sowie die der IUD-Stuten/rIP (Gruppe 4: Ssc 0,80 bis 5,50) auf, die Expression stellt sich im Vergleich zur Gruppe 1 lediglich geringfügig schwächer dar (vgl. Abb. 4.12, S. 54). Die basalen Drüsenzellen der Gruppe 3 (Ssc 1,30 bis 3,85) zeigen die niedrigsten Werte, die Expression liegt jedoch, wie in den anderen Gruppen, im gering- bis mittelgradigen Bereich. Signifikante Gruppenunterschiede (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) sind nicht nachweisbar.

Tab. 4.11: Gruppenspezifischer Prozentsatz Uterokalin-exprimierende Zellen (PP)

Uterokalin		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
apikale Drüsen	PP (%)	95 - 100	100	100	100
mittlere Drüsen	PP (%)	100	100	100	100
basale Drüsen	PP (%)	100	100	100	100
Gesamt	PP (%)	15 - 100	2 - 100	4 - 100	4 - 100
LE+AS	PP (%)	15 - 90	2 - 100	40 - 100	40 - 100

Legende zu Tab. 4.11: KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

4.4.2.3 Gesamtscore der Uterokalin-Expression

Insgesamt zeigen die Zellen der Gruppe 1 (Ssc 1,00 bis 4,94) und der Gruppe 4 (Ssc 0,63 bis 4,08) eine gering- bis mittelgradige UK-Expression. Dagegen weisen die Zellen der KB-Stuten der Gruppe 2 (Ssc 0,59 bis 3,63) lediglich eine überwiegend geringgradige Expression des Proteins (vgl. Abb. 4.15, S. 57) auf. Die UK-Expression der Zellen in Gruppe 3 ist mit der Expression der Drüsenzellen in Gruppe 2 vergleichbar. Der Ssc der IUD-Stuten der Gruppe 3 (Ssc 0,78 bis 2,24) ist jedoch etwas geringer ausgeprägt. Insgesamt lassen sich keine statistischen signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen ermitteln.

4.4.2.4 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Es stellen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der UK-Expression zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) dar, jedoch zeigt sich sowohl hinsichtlich aller immunhistologisch untersuchten Zellpopulationen (LE+AS, aDr, mDr, bDr - nicht graphisch dargestellt) als auch hinsichtlich des Gesamtscores eine erhöhte UK-Expression in den Gruppen 1 und 4 im Vergleich zu den Gruppen 2 und 3 (vgl. Abb. 4.12, S. 53).

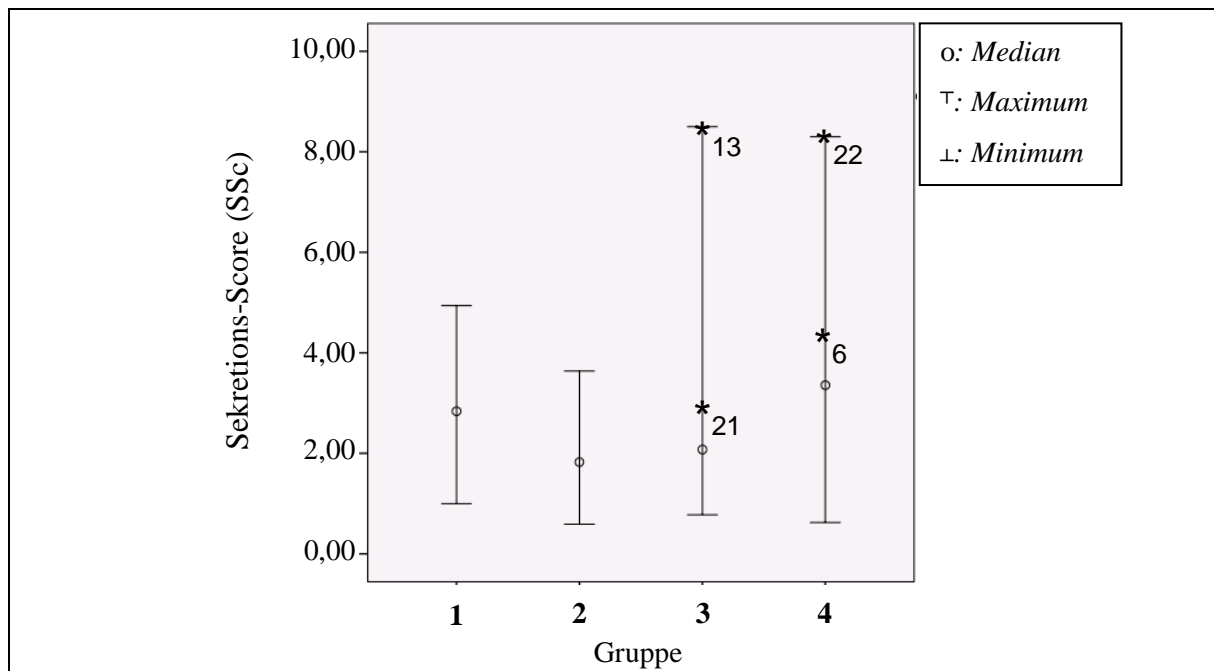


Abb. 4.13: Uterokalin-Expression (Gesamtscore) der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.13: In der Abbildung 4.13 sind die abweichenden Werte (Ausreißer, *13, *22) gekennzeichnet. Als Orientierungspunkt ist zusätzlich der darunterliegende SSc (#: Wert unterhalb Ausreißer-Wert) der Stute 21 (Gruppe 3) und der SSc der Stute 6 (Gruppe 4) abgebildet; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

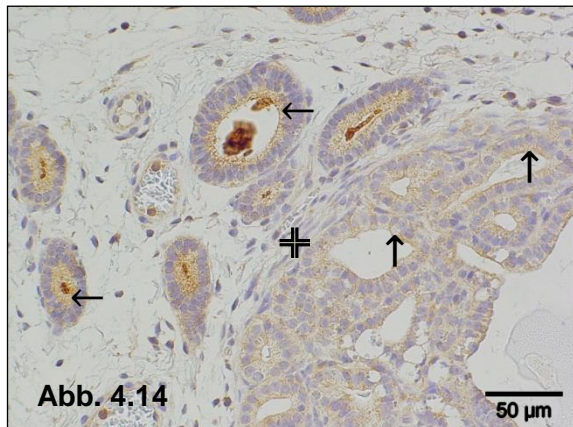
4.4.2.5 Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose

In den Drüsenzellen der Endometrose erfolgt die UK-Expression zumeist zyklusasynchron im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Drüsenepithelien, mit vorwiegend (n = 17) einer verminderten Expression (vgl. Tab. 4.12; Abb. 4.14, S. 57). Lediglich in zwei Fällen ist eine verstärkte Expression innerhalb der fibrotischen Areale nachweisbar. Eine zyklussynchrone UK-Expression innerhalb der Endometrose verglichen mit den unveränderten umliegenden Drüsenzellen ist ebenfalls teilweise nachweisbar (n = 5).

Tab. 4.12: Graduelle Abweichung der Uterokalin-Expression in der Endometrose zum unveränderten Endometrium

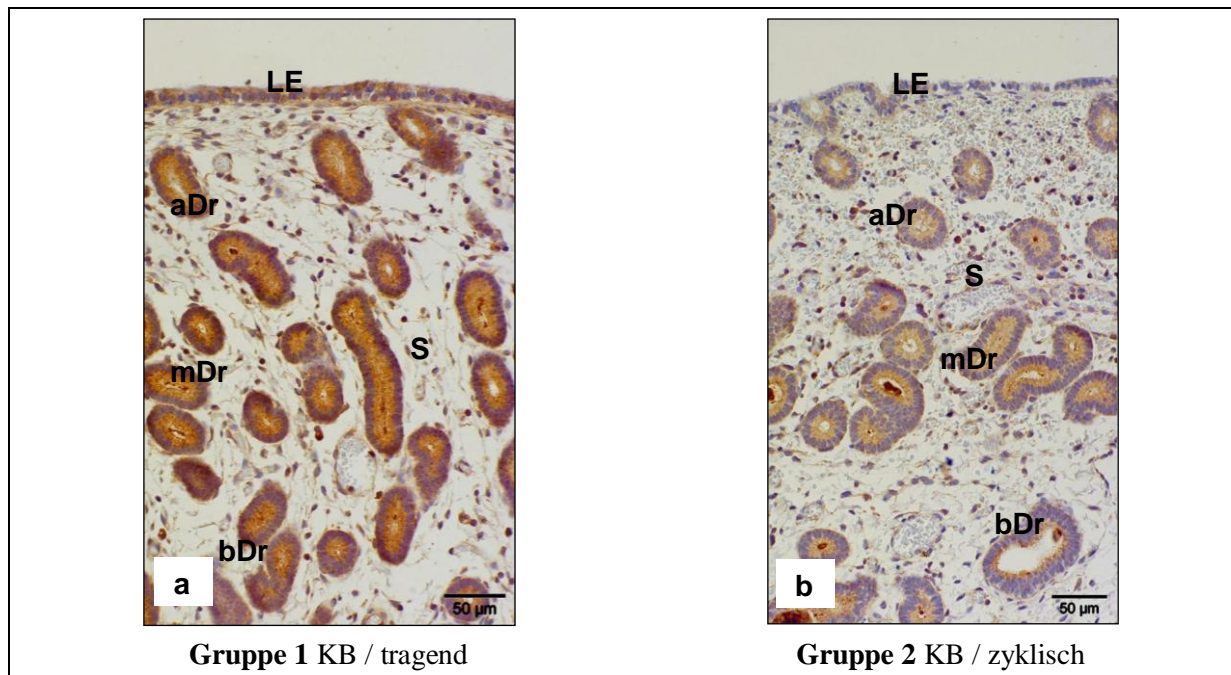
UK-Expression Endometrose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
vermindert ↓	n = 17	4	4	5	4
gleich =	n = 5	1	2	0	2
erhöht ↑	n = 2	0	0	1	1

Legende zu Tab. 4.12: n: Anzahl, KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

**Abb. 4.14:**

Endometrium, Immunhistologie, Uterokalin (UK)-Expression

Die UK-Expression der unveränderten Drüsenzellen (←) ist geringgradig ausgeprägt. Die Drüsenzellen (↑) innerhalb der Endometrose (‡) zeigen im Vergleich dazu eine schwächere UK-Expression.

**Abb. 4.15 a, b:** *Endometrium, Immunhistologie, Uterokalin (UK)-Expression*

Gruppenunabhängig ist die UK-Expression in den mittleren (mDr) und basalen Drüsen (bDr) deutlich, während die Expression im luminalen Epithel (LE) und apikalen Drüsen (aDr) geringer ist. Die graviden KB (künstlich besamt) Stuten (a) zeigen eine erhöhte UK-Expression im Vergleich zu den zyklischen KB-Stuten (b); Stroma (S)

4.4.3 Uteroglobulin (UG)

Gruppenunabhängig ist der Ssc-Gesamtscore von Uteroglobulin überwiegend (27/30 Stuten) lediglich angedeutet (Ssc 0,04 bis 0,58) und nimmt von dem luminalen Epithel und den Zellen der Ausführungsgänge (Ssc 0,00 bis 0,20) hin zu den basalen Drüsenzellen (Ssc 0,10 bis 1,65) zu. In allen Gruppen zeigen das luminal Epithel, die Ausführungsgänge, die apikalen (Ssc 0,00 bis 0,40) und die mittleren Drüsenzellen (Ssc 0,00 bis 0,40) keine bzw. maximal eine angedeutete Expression. Signifikante Gruppenunterschiede (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) lassen sich somit hinsichtlich dieser Zellpopulationen nicht nachweisen (vgl. Abb. 4.16, S. 58; Tab. 4.13, S. 59). Daher sind im Folgenden lediglich die Ergebnisse der basalen Drüsenzellen dargestellt.

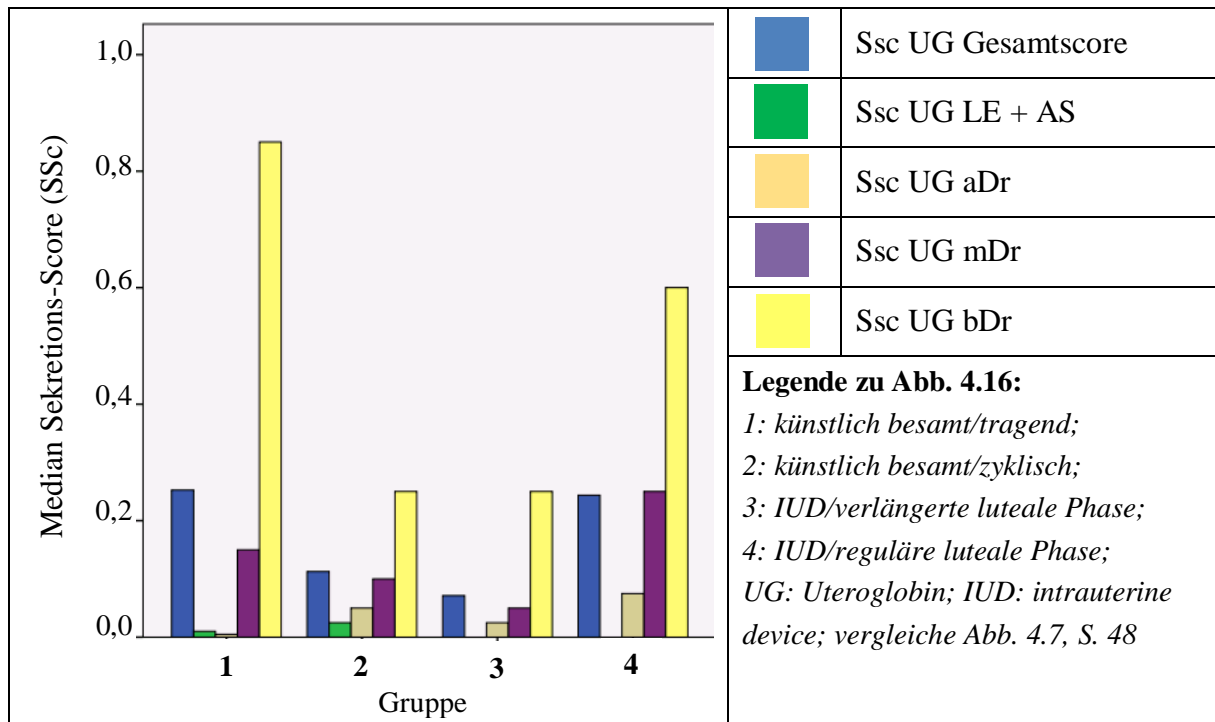


Abb. 4.16: Gruppenspezifischer Median des Sekretions-Scores der Uteroglobulin exprimierenden Zellen

4.4.3.1 Uteroglobulin-Expression in den basalen Drüsenzellen (bDr)

Die stärkste UG-Expression besitzen die basalen Drüsenzellen der Gruppe 1 (Ssc 0,15 bis 1,30), die in diesem Fall überwiegend (5/8 Stuten) geringgradig ausgeprägt ist. In der Gruppe 2 (4/7 Stuten) und 3 (5/7 Stuten) ist diese Zellpopulation durch eine meist andeutete UG-Expression gekennzeichnet. Der Ssc der Gruppe 2 reicht von 0,10 bis 1,15, der der Gruppe 3 von 0,10 bis 1,65.

Bei den IUD-Stuten der Gruppe 4 ist eine andeutete bis geringgradige Expression nachweisbar (Ssc 0,10 bis 1,50; vgl. Abb. 4.16; Abb 4.17, S. 59).

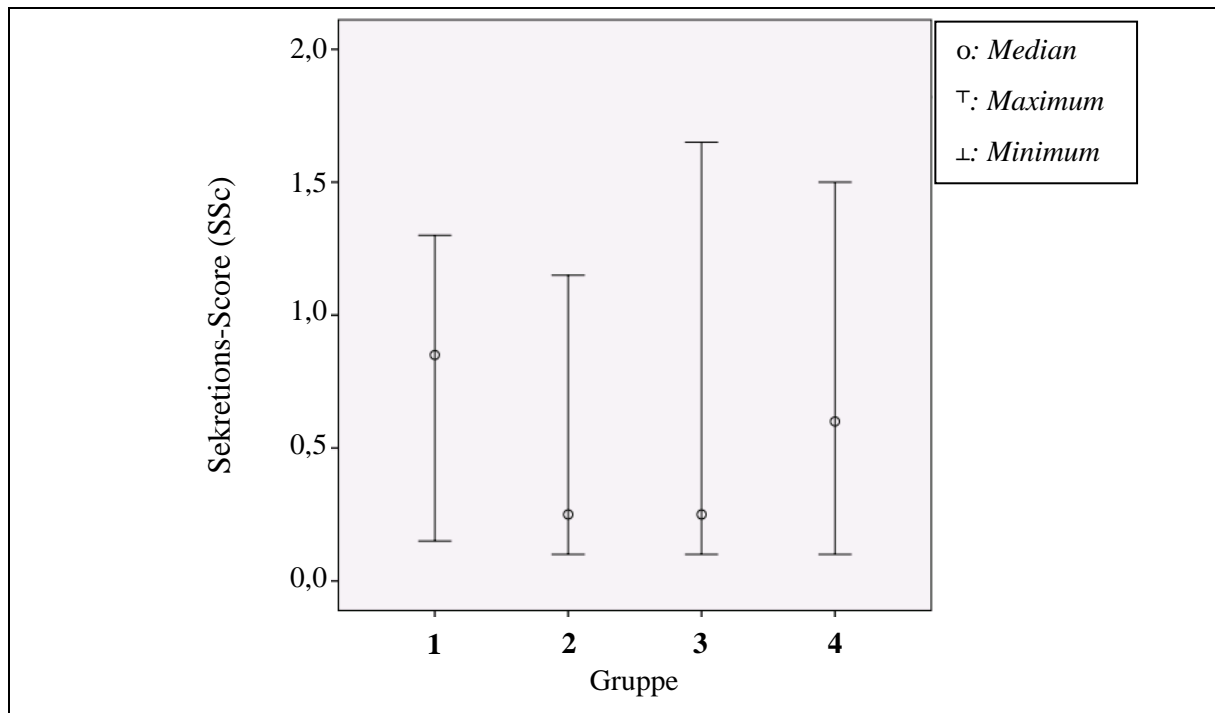


Abb. 4.17: Uteroglobin-Expression der basalen Drüsenzellen der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.17: vergleiche Abb. 4.1, S. 41

Tab. 4.13: Gruppenspezifischer Prozentsatz Uteroglobin-exprimierende Zellen (PP)

Uteroglobin		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
apikale Drüsen	PP (%)	0 - 100	0 - 70	0 - 40	0 - 40
mittlere Drüsen	PP (%)	0 - 60	10 - 80	5 - 70	10 - 100
basale Drüsen	PP (%)	25 - 100	15 - 100	15 - 90	20 - 1000
Gesamt	PP (%)	0 - 100	0 - 100	0 - 90	0 - 100
LE+AS	PP (%)	0 - 7	0 - 10	0 - 5	0 - 35

Legende zu Tab. 4.13: KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

4.4.3.2 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) zu ermitteln. Dennoch zeigen sich **Abstufungen** in der Proteinkonzentration der basalen Drüsen mit einer geringgradig erhöhten Expression in den Gruppen 1 und 4 im Vergleich zu den Gruppen 2 und 3 (vgl. Abb. 4.17; Abb. 4.18 a, b, S. 60).

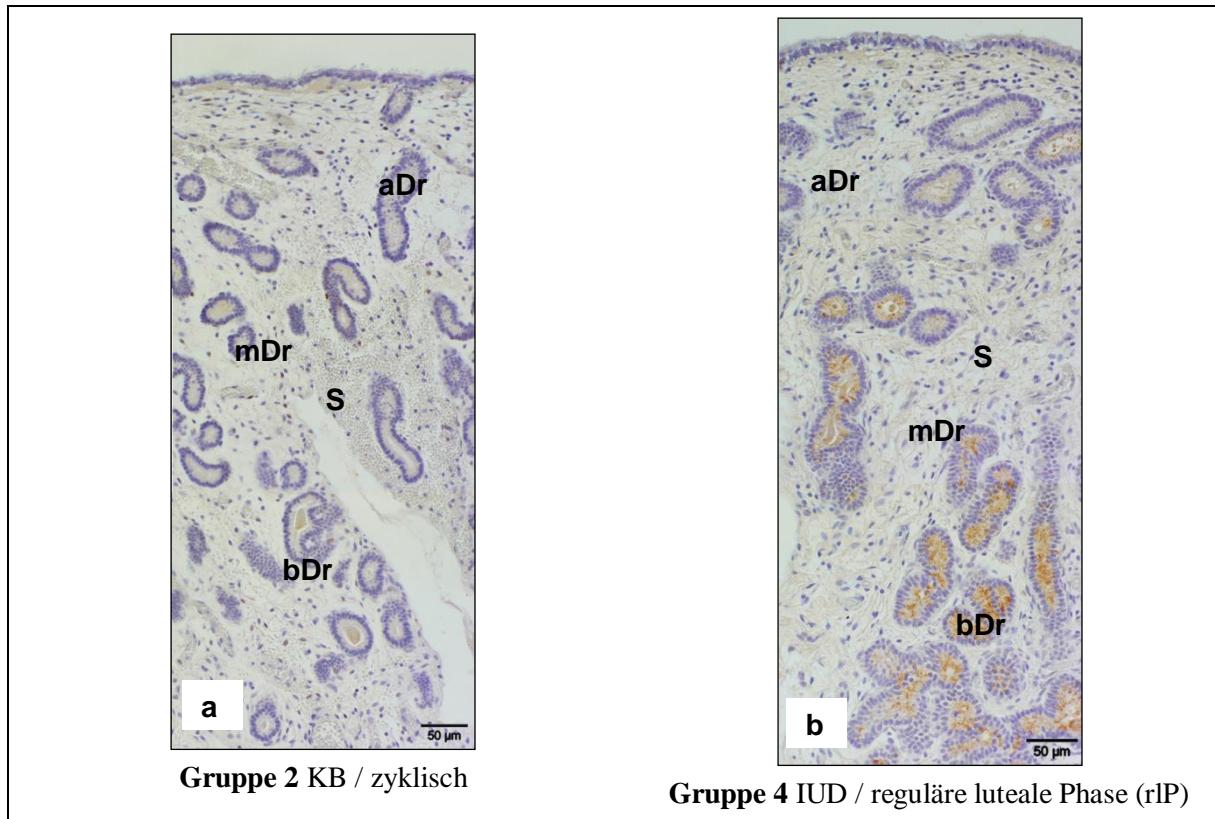


Abb. 4.18 a, b: Endometrium, Immunhistologie, Uteroglobulin (UG)-Expression

Bei den IUD-(intrauterine device)-Stuten/rLP (b) zeigen die basalen Drüsenzellen (bDr) eine geringgradige UG-Expression. Die apikalen (aDr) und mittleren Drüsenzellen (mDr) dieser Stuten sowie alle Drüsenzellen (aDr, mDr, bDr) der KB (künstlich besamt) Stuten/zyklisch (a) zeigen keine bzw. maximal eine angedeutete (nicht abgebildet) UG-Expression; Stroma (S)

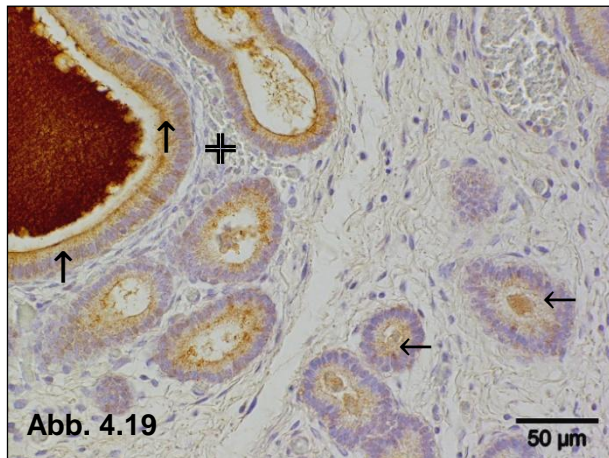
4.4.3.3 Graduelle Abweichung des Ssc in der Endometrose

Die Drüsenzellen innerhalb einer Endometrose zeigen eine überwiegend zyklusasynchrone UG-Expression im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Uterindrüsen mit einer meist erhöhten ($n = 18$), lediglich vereinzelt verminderten UG-Expression (Tab. 4.14; Abb. 4.19, S. 61). In fünf Biopaten lässt sich eine zyklussynchrone UG-Expression in den Drüsenepithelien der fibrotischen Herde bezogen auf das unveränderte Endometrium nachweisen.

Tab. 4.14: Graduelle Abweichung der Uteroglobulin-Expression in der Endometrose
zum unveränderten Endometrium

UG-Expression Endometrose		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vLP	4 IUD / rLP
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
vermindert ↓	$n = 1$	0	0	1	0
gleich =	$n = 5$	2	1	1	1
erhöht ↑	$n = 18$	3	5	4	6

Legende zu Tab. 4.14: n : Anzahl; UG: Uteroglobulin; KB: künstlich besamt; vergleiche Abb. 4.1, S. 41

**Abb. 4.19:**

*Endometrium, Immunhistologie,
Uteroglobulin (UG)-Expression*

Die unveränderten Drüsenzellen (←) zeigen eine angedeutete UG-Expression, während die Drüsenzellen (↑) innerhalb der periglandulären Fibrose (⊕) durch eine mittelgradige Expression des Proteins gekennzeichnet sind.

4.4.4 Zusammenfassung Proteinexpression

Im Vergleich zu dem Median des gesamten (n=30) Untersuchungsmaterials (vgl. Tab. 4.15) zeigen die KB-Stuten der Gruppe 2 (zyklisch) hinsichtlich aller immunhistologisch untersuchten Proteine (UF, UK, UG) einen niedrigen Sekretionsscore. Im Gegensatz dazu ist eine starke Expression der drei Proteine (UF, UK, UG) in der Gruppe 4 (IUD-Stuten, reguläre Lutealphase) zu beobachten. In der Gruppe 1 (KB-Stuten, tragend) ist eine geringe UF-Expression und eine deutliche UK- und UG-Expression nachweisbar. Die IUD-Stuten der Gruppe 3 (verlängerte Lutealphase) weisen geringe Konzentrationen von UK und UG auf und eine starke UF-Expression. Eine Übersicht gibt Tab. 4.15.

Tab. 4.15: Gruppenspezifische Proteinexpression (Median Gesamtscore)

Proteine	Gesamt Median (n = 30)	Gruppe							
		1 KB / tragend M (n = 8)		2 KB / zyklisch M (n = 7)		3 IUD / vLP M (n = 7)		4 IUD / rLP M (n = 8)	
Uteroferrin	0,88	↓	0,68	↓	0,86	↑	1,30	↑	1,12
Uterokalin	2,17	↑	2,84	↓	1,83	↓	2,08	↑	3,36
Uteroglobulin	0,23	↑	0,25	↓	0,11	↓	0,07	↑	0,24

Legende zu Tab. 4.15: Gesamt-Median: Median des gesamten (n=30) Untersuchungsmaterials ; ↑ = erhöhte Expression-Vergleich zum Gesamt-Median; ↓ = verminderte Expression-Vergleich zum Gesamt-Median; KB: künstlich besamt; IUD: intrauterine device; vLP: verlängerte luteale Phase; rLP: reguläre luteale Phase; M: gruppenspezifischer Median

4.5 Immunhistologische Ergebnisse zum Nachweis von Steroidhormonrezeptoren

Es wurden alle 30 Biopate immunhistologisch auf die Expression von Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) untersucht. Es werden die gruppenspezifischen Unterschiede in der Expression dargestellt. Zu diesem Zweck wird der Immunreaktive Score (IRS) des luminalen Epithels und der Zellen der Ausführungsgänge (LE/AS), der Drüsenzellen (DZ) (apikale, mittlere und basale Drüsenzellen) und der Stromazellen (SZ) aufgeführt. Die Ergebnisse der apikalen, mittleren und basalen Drüsenzellen werden aufgrund der lediglich geringen Unterschiede hinsichtlich ihrer Expressionsintensität und der Anzahl der positiv mit dem verwendeten Antikörper reagierenden Zellen zu einem IRS-Wert zusammengefasst (Mittelwert IRS: $\text{IRS aDr} + \text{IRS mDr} + \text{IRS bDr} / 3$). Die genannten Zellpopulationen exprimieren ER und PR intranukleär diffus.

Die **Prozentsätze** der positiv mit dem Antikörper reagierenden immunhistologisch untersuchten Zellen variieren und werden in Tabellenform dargestellt (vgl. Tab. 4.16; Tab. 4.17, S. 67).

4.5.1 Östrogenrezeptoren

Der IRS-Wert liegt im Bereich des LE zwischen 0,00 und 0,06 (vgl. Abb. 4.20, S. 63). In den Drüsenzellen kann teils keine Expression beobachtet werden oder dezent höhere IRS-Werte (IRS 0,00 bis 2,35) im Vergleich zu dem LE. Die Stromazellen weisen IRS-Werte zwischen 0,05 bis 1,55 auf (vgl. Abb. 4.21, S. 64; Abb. 4.22, S. 64).

Tab. 4.16: Gruppenspezifischer Prozentsatz ER-exprimierender Zellen (PP)

Östrogenrezeptoren		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	PP (%)	0 - 10	0 - 20	0 - 10	5 - 20
Drüsenzellen	PP (%)	0 - 45	5 - 50	0 - 50	0 - 40
Stromazellen	PP (%)	0 - 35	5 - 40	5 - 40	10 - 50

Legende zu Tab. 4.16: ER: Östrogenrezeptoren; KB: künstlich besamt; IUD: intrauterine device; vIP: verlängerte luteale Phase; rIP: reguläre luteale Phase; PP: Prozentsatz positiv mit dem Antikörper reagierender Zellen; LE: luminales Epithel

4.5.1.1 Östrogenrezeptor-Expression im luminalen Epithel (LE) und den Ausführungsgängen (AS)

In allen Gruppen erreicht die Östrogenrezeptorexpression in den Zellen des LE/AS maximal sehr geringe IRS-Werte, jedoch kann mittels der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen den IUD-Stuten der Gruppe 3 (IRS 0,00 bis 0,10) und 4 (IRS 0,05 bis 0,60) ermittelt werden, wobei die IUD-Stuten mit einer regulären Lutealphase (Gruppe 4) dezent höhere IRS-Werte aufweisen (vgl. Abb. 4.20, S. 63). Der IRS-Wert der Zellen des

LE/AS der KB-Stuten reicht in Gruppe 1 (tragend) von 0,00 bis 0,10 sowie in Gruppe 2 (zyklisch) von 0,00 bis 0,02.

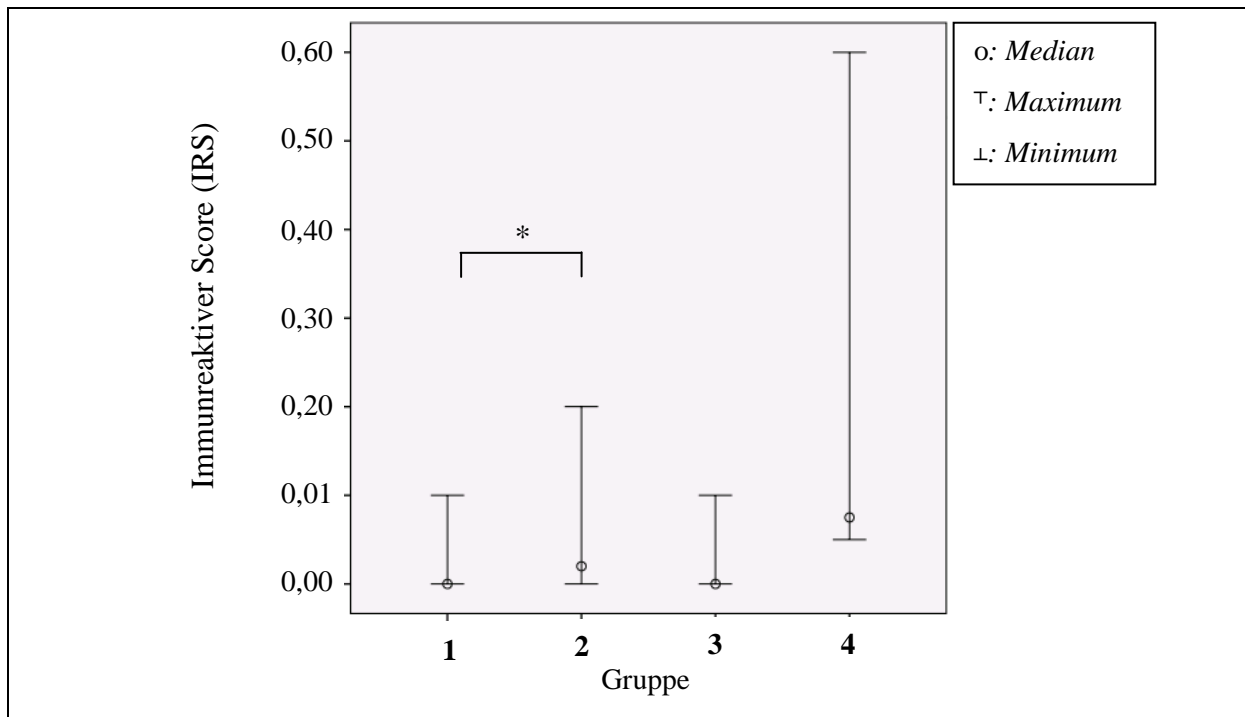


Abb. 4.20: Östrogenrezeptor-Expression des luminalen Epithels und der Ausführungsgänge in den verschiedenen Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.20: 1: künstlich besamt/tragend; 2: künstlich besamt/zyklisch (nicht-tragend); 3: IUD/verlängerte luteale Phase; 4: IUD/reguläre luteale Phase; IUD: intrauterine device; ER: Östrogenrezeptor; LE: luminales Epithel; AS: Ausführungsgänge; * statistisch signifikant ($p < 0,0125$; Mann-Whitney-U-Test)

4.5.1.2 Östrogenrezeptor-Expression in den Drüsenzellen (DZ)

In allen Gruppen ist in den DZ keine ER-Expression oder lediglich eine angedeutete bis geringgradige Expression nachweisbar (IRS 0,00 bis 1,62), wobei die zyklischen KB-Stuten (IRS 0,08 bis 0,90) die dezent höheren IRS-Werte im Vergleich zu den KB-Stuten der Gruppe 1 (IRS 0,00 bis 1,62) erreichen (vgl. Abb. 4.21, S. 64). Die ER-Expression der Gruppen 3 (IRS 0,00 bis 0,70) und 4 (IRS 0,02 bis 0,95) weist vergleichbare Werte auf.

4.5.1.3 Östrogenrezeptor-Expression in den Stromazellen (SZ)

In den SZ aller Gruppen lässt sich eine angedeutete bis geringgradige ER-Expression nachweisen (IRS 0,05 bis 1,55). Vergleichbar hohe IRS-Werte erreichen die SZ der Stuten in der Gruppe 1 (IRS 0,05 bis 0,60) und Gruppe 3 (IRS 0,05 bis 1,10), wobei die Expressionsintensität überwiegend angedeutet ausgeprägt ist (11/15 Stuten). Im Vergleich dazu zeigt sich die Expression dieses Rezeptors in den SZ der Gruppe 2 (IRS 0,20 bis 1,08) und Gruppe 4 (IRS 0,20 bis 1,55) dezent erhöht und die Zellpopulation ist durch eine angedeutete bis geringgradig intensive Expression gekennzeichnet. Statistisch auffällige Unterschiede lassen sich

zwischen der Gruppe 3 und 4 nachweisen. Bei den IUD-Stuten mit einer regulären Lutealphase (Gruppe 4) ist dabei der höchste IRS-Werte zu beobachten (vgl. Abb. 4.22, S. 64).

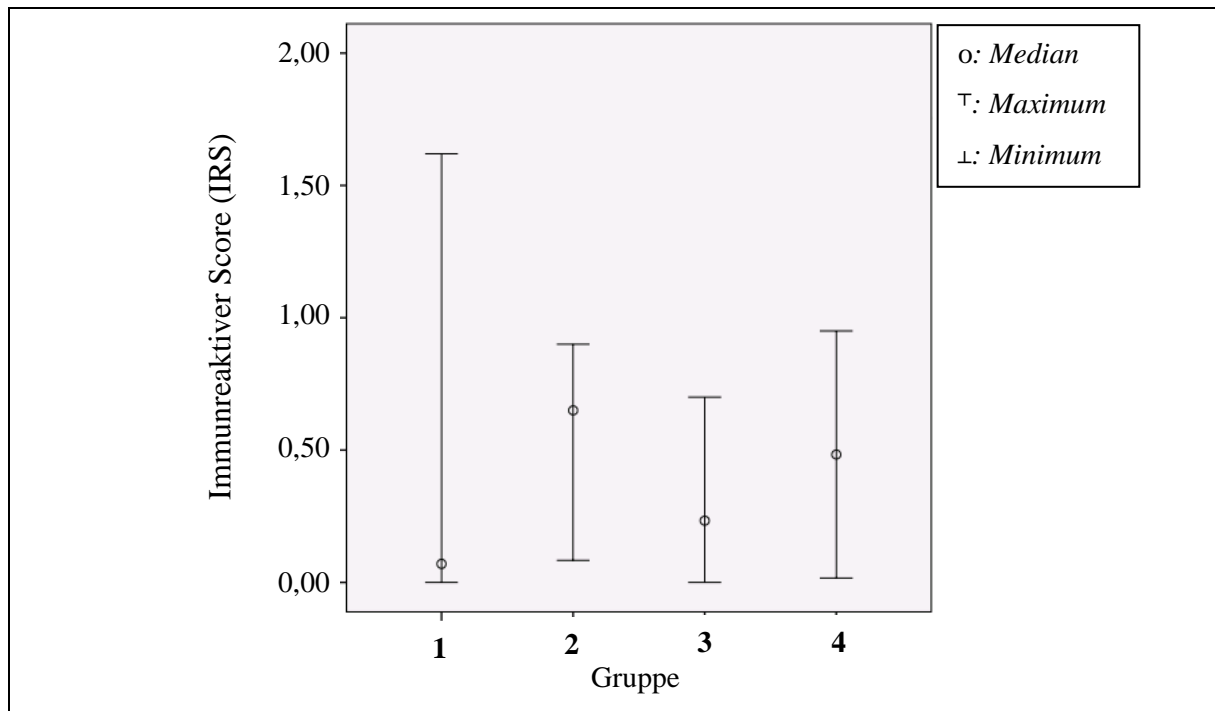


Abb. 4.21: Östrogenrezeptor-Expression der Drüsenzellen in den Stutengruppen

Legende Abb. 4.21: vergleiche Abb. 4.20, S. 63

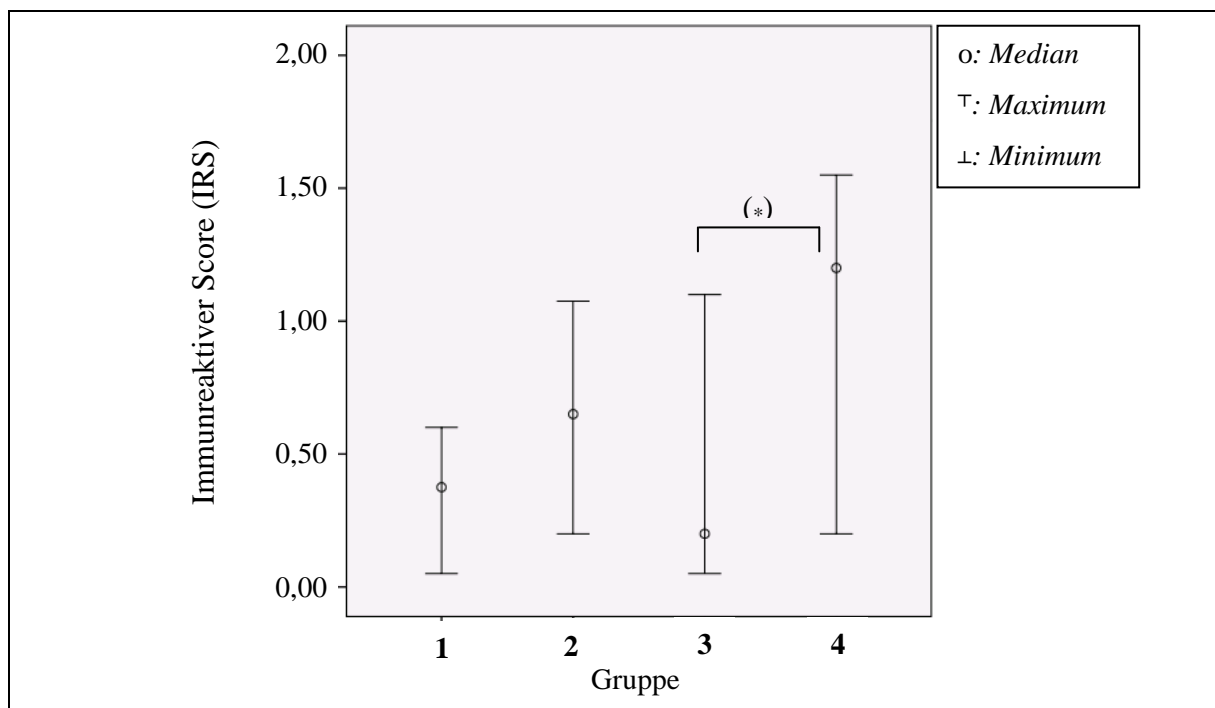


Abb. 4.22: Östrogenrezeptor-Expression der Stromazellen in den Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.22: vergleiche Abb. 4.20, S. 63, (*) statistisch auffällig ($0,0125 < p > 0,025$; Mann-Whitney-U-Test)

4.5.1.4 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) sind **statistisch signifikante** Unterschiede hinsichtlich der Immunreaktivität des LE/AS zwischen den IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) zu beobachten, wobei die IUD-Stuten der Gruppe 4 dezent höhere IRS-Werte zeigen. Zudem können auch **statistisch auffällige** Werte in Bezug auf die SZ der IUD-Stuten ermittelt werden (vgl. Abb. 4.22, S. 64). Dabei zeigen die IUD-Stuten mit einer regulären Lutealphase (Gruppe 4) die höheren IRS-Werte.

Insgesamt sind die Gruppen 2 und 4 hinsichtlich aller immunhistologisch untersuchten Zellpopulationen stets durch höhere IRS-Werte gekennzeichnet als die entsprechenden Zellpopulationen in den Gruppen 1 und 3 (vgl. Abb. 4.23 a, b). Diese Differenzen lassen sich allerdings statistisch nicht zwischen allen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) Gruppen absichern.

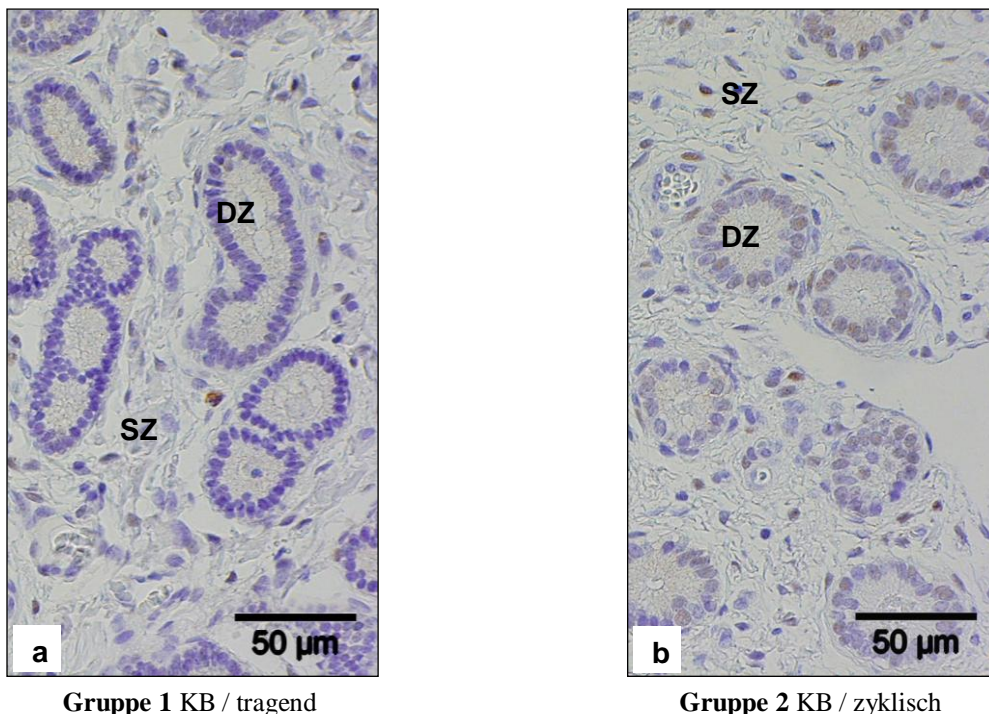


Abb. 4.23 a, b: Endometrium, Immunhistologie, Östrogenrezeptor (ER)-Expression

Die Drüsenzellen (DZ) und Stromazellen (SZ) der tragenden KB-Stuten (a) zeigen zum Teil keine ER-Expression. Dagegen weisen mehrere Drüsenzellen (DZ) und Stromazellen (SZ) der Stuten der Gruppe 2 (b) eine geringgradige ER-Expression auf; KB: Künstlich besamt

4.5.2 Progesteronrezeptoren

Die immunhistologisch untersuchten Zellen weisen im Bezug auf die Progesteronrezeptor (PR)-Expression eine weitgehende Übereinstimmung zu den Ergebnissen der ER-Expression auf. Im Vergleich zu der ER-Expression ist jedoch die PR-Expression in den DZ (IRS 0,00 bis 0,70) insgesamt geringer ausgeprägt, dagegen in den SZ teils dezent erhöht (IRS 0,00 bis 3,60).

4.5.2.1 Progesteronrezeptor-Expression im luminalen Epithel (LE) und den Ausführungsgängen (AS)

Gruppenunabhängig zeigen das luminale Epithel und die Zellen der Ausführungsgänge überwiegend (27/30 Stuten) keine PR-Expression (IRS 0,00 bis 0,05). Somit sind statistisch signifikante Unterschiede nicht zu ermitteln.

4.5.2.2 Progesteronrezeptor-Expression in den Drüsenzellen (DZ)

Die DZ der IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) sowie der KB-Stuten der Gruppe 1 zeigen vorwiegend (18/23 Stuten) keine PR-Expression. In den Zellen der KB-Stuten/zyklisch (Gruppe 2) hingegen sind IRS-Werte zwischen 0,00 und 0,70 nachweisbar (vgl. Abb. 4.24, S. 66). Der Unterschied lässt sich statistisch jedoch nicht absichern.

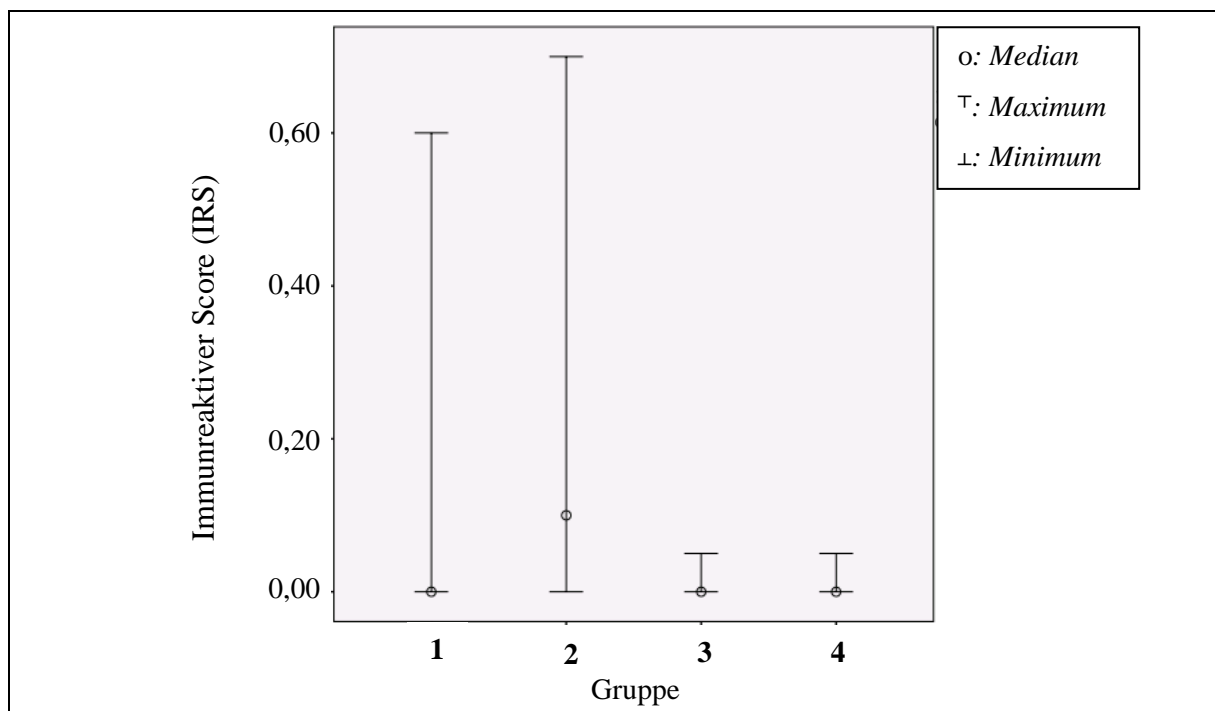


Abb. 4.24: Progesteronrezeptor-Expression der Drüsenzellen in den Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.24: vergleiche Abb. 4.20, S. 63

4.5.2.3 Progesteronrezeptor-Expression in den Stromazellen (SZ)

Die SZ der Stuten aus den Gruppen 1 (IRS 0,00 bis 2,10) und 3 (IRS 0,00 bis 0,55) weisen eine überwiegend (13/15 Stuten) angedeutete PR-Expression auf, dagegen ist bei den SZ der IUD-Stuten/rIP (Gruppe 4) eine dezent erhöhte PR-Konzentration zu beobachten (IRS 0,20 bis 2,10). Eine Besonderheit zeigt sich in Gruppe 2, in welcher, im Vergleich zu den übrigen Gruppen, ein deutlich höherer PR-IRS-Wert (IRS 0,03 bis 3,60) in den SZ nachweisbar ist (vgl. Abb. 4.25, S. 67, Abb. 4.26, S. 68). Zwischen den Gruppen der KB-Stuten (Gruppe 1 und 2) sowie zwischen den Gruppen der IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) lassen sich statistisch signifikante Unterschiede ermitteln, wobei die KB-Stuten/zyklisch (Gruppe 2) sowie die IUD-Stuten/vIP (Gruppe 4) jeweils höhere IRS-Werte erreichen.

4.5.2.4 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) sind **statistisch signifikante** Unterschiede hinsichtlich der Immunreaktivität der SZ zu ermitteln. Die Rezeptor-Expression in den SZ ist in Gruppe 2 deutlich höher als in der Gruppe 1 und in Gruppe 4 höher als in Gruppe 3 (vgl. Abb. 4.26, S. 68). Das LE/AS und die DZ weisen in allen Gruppen überwiegend keine PR-Expression, somit sind keine Unterschiede (vgl. Abb. 4.25) zwischen den Gruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) zu ermitteln.

Tab. 4.17: Gruppenspezifischer Prozentsatz PR-exprimierender Zellen (PP)

Progesteron-Rezeptoren (PR)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	PP (%)	0	0 - 5	0	0
Drüsenzellen	PP (%)	0 - 20	0 - 30	0 - 5	0 - 5
Stromazellen	PP (%)	5 - 50	30 - 60	0 - 40	20 - 50

Legende zu Tab. 4.17: vergleiche Tab. 4.16, S. 62

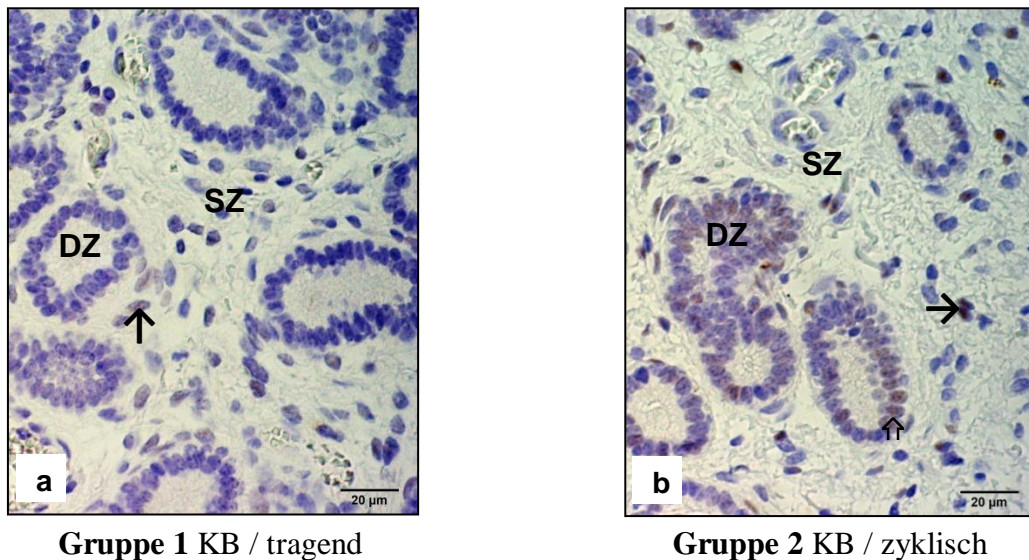


Abb. 4.25 a, b: Endometrium, Immunhistologie, Progesteronrezeptor (PR)-Expression

Die zyklischen KB-Stuten (b) sind im Vergleich zu den tragenden KB-Stuten (a) durch eine Zunahme der PR-Expression sowohl in den Stromazellen (SZ →; gering- bis mittelgradig), als auch in den Drüsenzellen (DZ ↑; angedeutet) gekennzeichnet. Die tragenden KB-Stuten (a) weisen lediglich eine angedeutete PR-Expression in den Stromazellen (SZ ↑) auf und zeigen keine PR-Expression in den Drüsenzellen.

4.6 Ki-67 Antigenexpression

Alle Proben (n = 30) wurden hinsichtlich ihrer Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Weder die Stromazellen noch die Epithelzellen des luminalen Epithels, der Ausführungsgänge und der Drüsen zeigen eine Ki-67 Antigen-Expression. Eine Proliferation der Epithel- und Stromazellen kann somit nicht nachgewiesen werden.

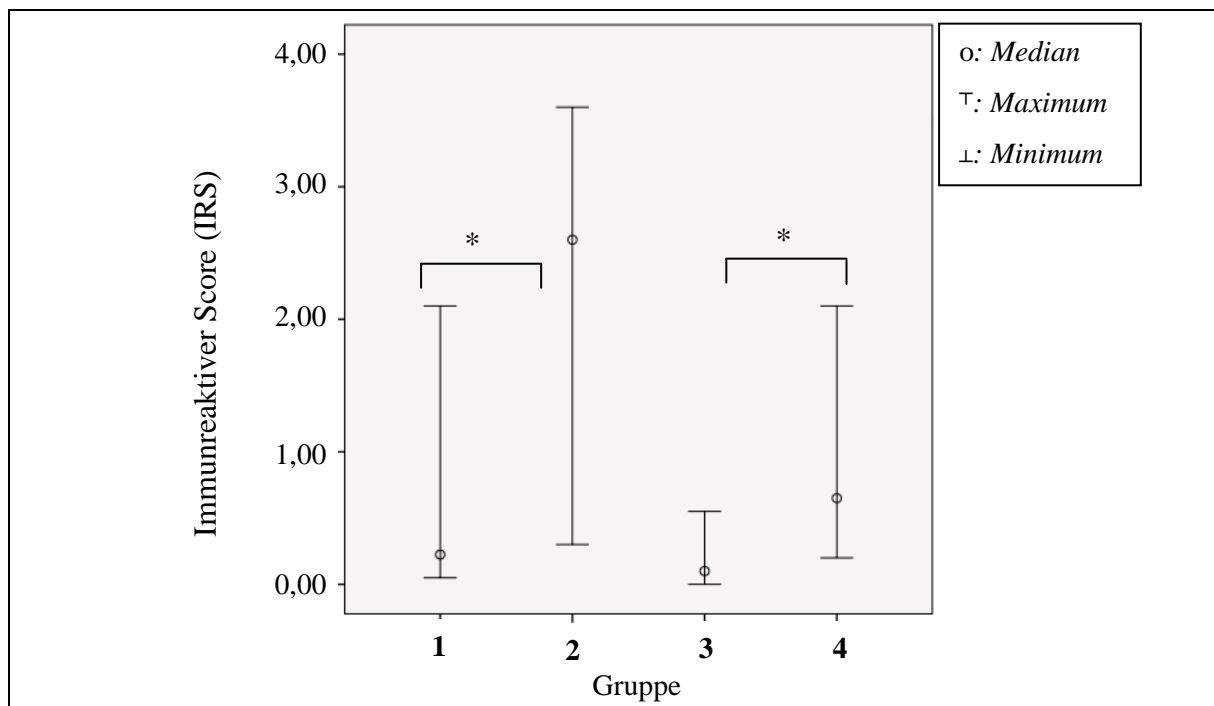


Abb. 4.26: Progesteronrezeptor-Expression in den Stromazellen der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.26: vergleiche Abb. 4.20, S. 63

4.7 Vergleichende histomorphologische und immunhistologische Untersuchung des Endometriums hinsichtlich des Auftretens von Entzündungszellen

Die Anzahl der freien Entzündungszellen wurde in den verschiedenen Schichten des Endometriums (vgl. Kap. 3.3, S. 33ff) bestimmt. Die Menge der Zellen im luminalen Epithel (LE), dem Stratum compactum (SC) und dem Stratum spongiosum (SS) werden einzeln dargestellt. Zudem wird die Gesamtzahl der vorkommenden Zellen pro Biopat (LE, SC, SS) aufgeführt. Pro Schicht wurden 10 HPF ausgezählt. Im Boxplot werden Extremwerte mit einem Stern (*) gekennzeichnet, Ausreißer sind mit einem Kreis dargestellt (◦).

4.7.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten wurden selektiv mittels Immunhistologie (CD 3) dargestellt und ausgezählt. In allen Proben sowie in sämtlichen Schichten des Endometriums kann diese Zellpopulation nachgewiesen werden, wobei die Infiltration überwiegend im Stratum compactum lokalisiert ist ($p < 0,017$; vgl. Abb. 4.28, S. 69; Abb. 4.29, S. 70). Bei drei Stuten wurde aufgrund des vermehrten Vorkommens von T-Lymphozyten im Stratum compactum mittels der H.-E.-Auswertung eine chronische nicht-eitrige Endometritis diagnostiziert (Stute-ID 11, 12, 29; vgl. Abb. 4.27, S. 69; Abb. 4.28, S. 69). In der quantitativen Auswertung zeigen diese Stuten im Vergleich zu der gesamten Versuchsgruppe ($n = 30$) im Stratum compactum ebenfalls eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten (Ausreißer, vgl. Abb. 4.29, S. 70). Bei den drei Stuten (Stuten ID 16, 21, 24) mit einer eitrigen Endometritis lässt sich keine deutliche Erhöhung der T-Zellen im Vergleich zu den übrigen Stuten nachweisen (vgl. Abb. 4.27, S. 69).

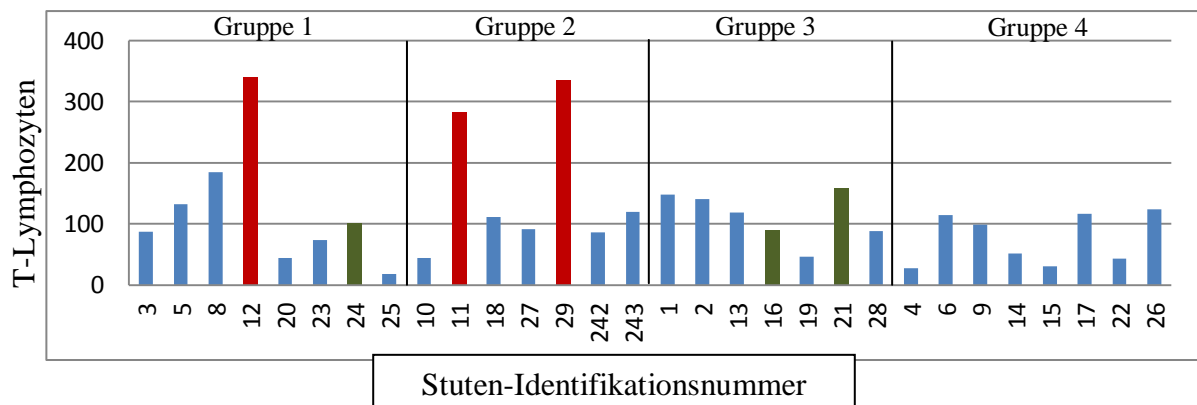


Abb. 4.27: Anzahl der T-Lymphozyten im Stratum compactum der Versuchstiere

Legende zu Abb. 4.27: rot: Stuten mit einer chronisch nicht-eitrigen Endometritis, grün: Stuten mit einer akut eitrigen Endometritis

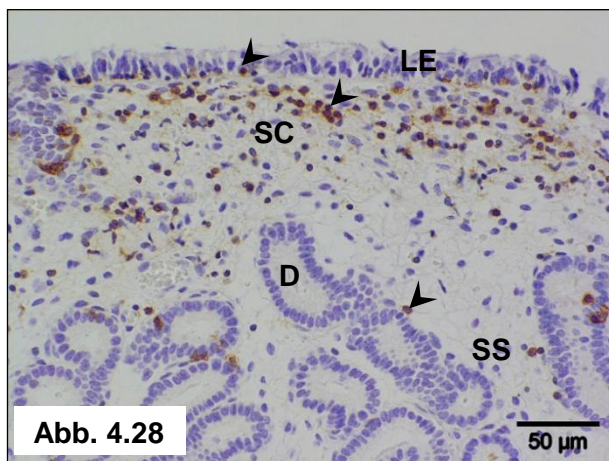


Abb. 4.28: Endometrium, Immunhistologie, CD3, Gruppe 1 (KB/tragend); KB: künstlich besamt

Die T-Lymphozyten (Pfeilspitzen) sind überwiegend im Stratum compactum (SC) und im darunter liegenden Stratum spongiosum (SS) sowie vereinzelt zwischen den luminalen Epithelzellen (LE) nachweisbar; Drüsen (D)

4.7.1.2 Ergebnisse im Gruppenvergleich

In der statistischen Auswertung zeigt sich kein signifikanter Gruppenunterschied (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) in Bezug auf die T-Zelldichte. Jedoch fällt im Bereich des **LE** eine geringgradig höhere Anzahl an T-Lymphozyten bei den IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) im Vergleich zu den KB-Stuten auf (vgl. Tab. 4.18, S. 70). Eine in etwa gleiche T-Zelldichte **in allen endometrialen Schichten** weisen die KB-Stuten (Gruppe 1 und 2) auf, dagegen liegt der Median der T-Lymphozyten der IUD/vIP-Stuten (Gruppe 4) über und der Wert der IUD/rIP-Stuten (Gruppe 3) unter dem der KB-Stuten (vgl. Tab. 4.18, S. 70). Die Stuten mit einer chronischen Endometritis (Stute-ID 11, 12, 29) sind in die Auswertung mit einbezogen worden, dabei handelt es sich ausschließlich um KB-Stuten. Die Stuten mit einer chronischen Endometritis sind erkennbar an dem erhöhten T-Lymphozyten-Maximum der KB-Stuten im Vergleich zu den IUD-Stuten (vgl. Tab. 4.18, S. 70), ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergibt nicht.

Tab. 4.18: Vorkommen der T-Lymphozyten in den Schichten des Endometriums *mit* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (n = 30)

T-Zellen (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	7 (0 - 20)	8 (1 – 27)	14 (1 – 18)	15 (0 – 24)
Str. c	Median	99 (18 – 340)	111 (44 – 335)	118 (46 – 159)	75 (27 – 124)
Str. sp.	Median	36 (22 – 84)	33 (12 – 60)	45 (22 – 60)	27 (8 – 119)
Gesamt	Median	135 (57 – 378)	157 (99 – 353)	169 (105 – 237)	119 (38 – 238)

Legende zu Tab. 4.18: Min.: Minimum; Max.: Maximum; KB: künstlich besamt; IUD: intrauterine device; vIP: verlängerte luteale Phase; rIP: reguläre luteale Phase; LE: luminales Epithel; Str. c.: Stratum compactum; Str. sp.: Stratum spongiosum; graue Kästen: auffällige Werte; n: Anzahl Stuten (10 High Power Fields/Schicht/Stute)

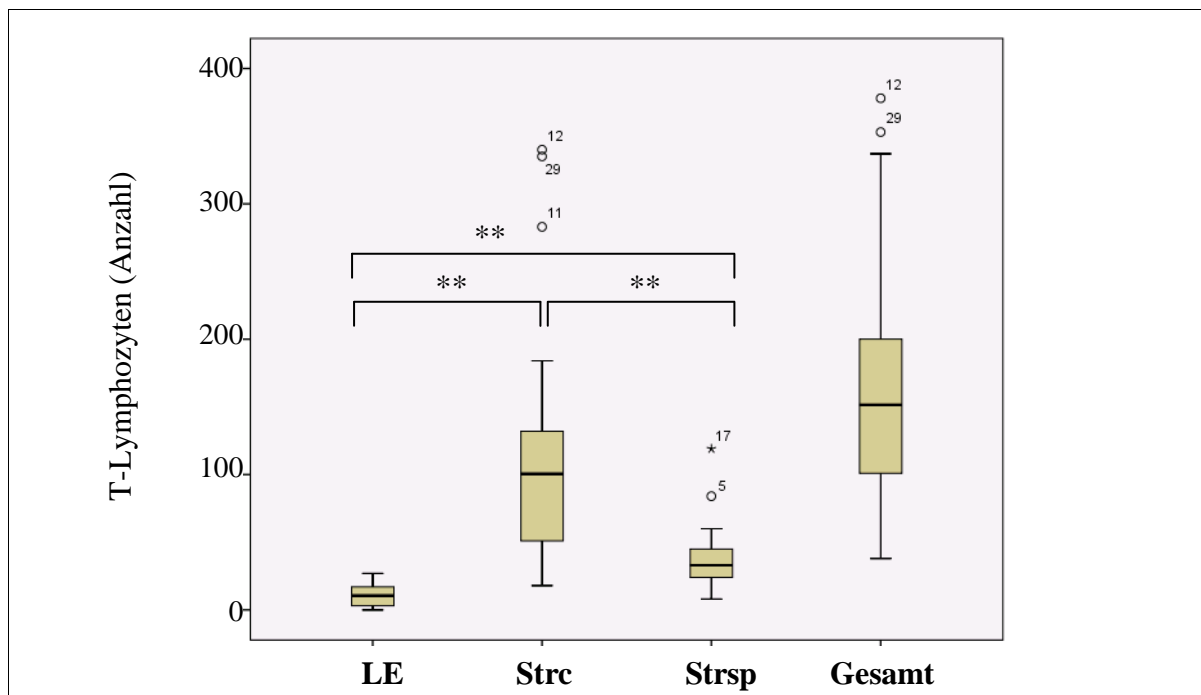


Abb. 4.29: Vorkommen der T-Zellen in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten *ohne* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.29: Fallbeschriftung (5, 11, 12, 17, 29): Stutenidentifikationsnummer, LE: luminales Epithel, Strc: Stratum compactum, Strsp: Stratum spongiosum, **: statistisch signifikant, *: Extremwert / o: Ausreißer-Wert im Boxplot, HPF: High Power Field 40er Vergrößerung

4.7.2 B-Lymphozyten

Die B-Zellen wurden mittels immunhistologischer Antikörper gegen das CD 79A Antigen dargestellt. Bei allen Stuten befinden sich B-Lymphozyten im Endometrium. Während im Stratum compactum und im Stratum spongiosum (vgl. Abb. 4.32, S. 72) B-Lymphozyten regelmäßig und in vergleichbaren Anzahl nachweisbar sind, wird diese Zellpopulation zwischen

den luminalen Epithelzellen lediglich sehr vereinzelt beobachtet (vgl. Abb. 4.30). Insgesamt ist die B-Zelldichte geringer im Vergleich zu der T-Zelldichte ($p < 0,01$).

Tab. 4.19: Vorkommen der B-Lymphozyten in den Schichten des Endometriums *mit* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit ($n = 30$)

B-Zellen (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	0 (0 – 0)	0 (0 – 6)	0 (0 – 3)	0 (0 – 7)
Str. c	Median	4 (0 – 27)	6 (2 – 14)	4 (0 – 8)	7 (3 – 13)
Str. sp.	Median	6 (0 – 20)	5 (2 – 12)	6 (0 – 13)	11 (0 – 21)
Gesamt	Median	10 (1 – 47)	14 (5 – 22)	12 (1 – 21)	18 (3 – 34)

Legende zu Tab. 4.19: vergleiche Tab. 4.18, S.70

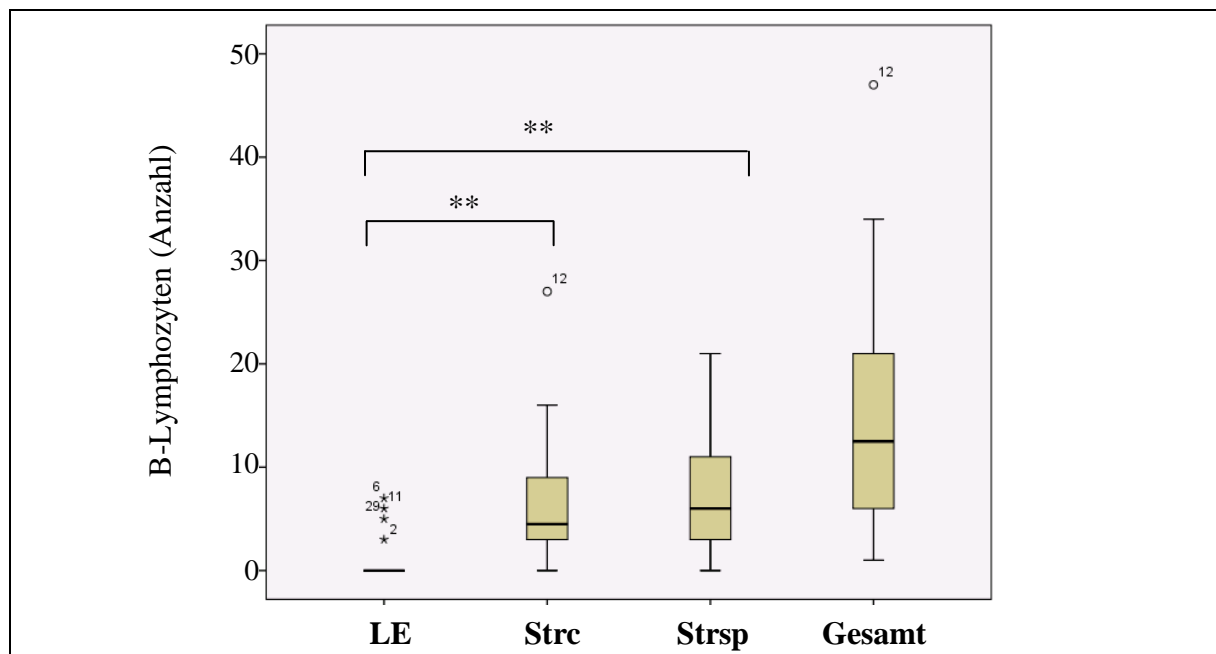


Abb. 4.30: Vorkommen der B-Zellen in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten *ohne* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.30: vergleiche Abb. 4.29, S. 70

4.7.2.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich können keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der B-Zelldichte ermitteln werden. Die IUD/rIP-Stuten (Gruppe 4) zeigen allerdings in allen Schichten die höchsten Werte (vgl. Tab. 4.19). Bei den Stuten mit einer chronisch nicht-eitrigen Endometritis aus Gruppe 1 und 2 weisen lediglich die Stuten Nr. 12 (Ausreißerwert im Boxplot, vgl. Abb. 4.30) und 29 eine vermehrte Anzahl dieser Zellpopulation im Vergleich zu den übrigen Tieren auf (vgl. Abb. 4.31, S. 72). Daneben sind zahlreichere B-Lymphozyten im Vergleich zu den anderen Versuchstieren ebenfalls bei der Stute Nr. 24 mit einer eitrigen Endometritis zu finden (vgl. Abb. 4.31, S. 72).

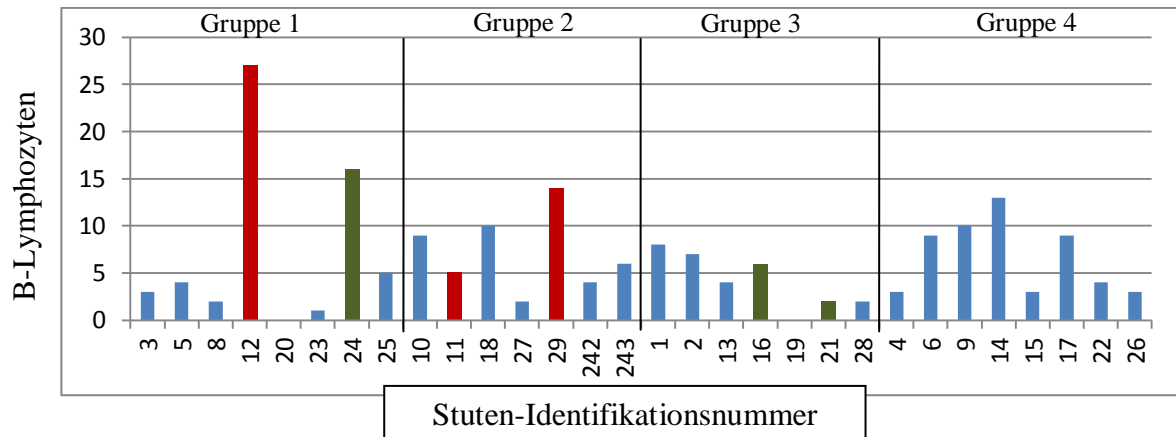


Abb. 4.31: Anzahl der B-Lymphozyten im Stratum compactum der Versuchstiere

Legende zu Abb. 4.31: siehe Abb. 4.27, S. 69

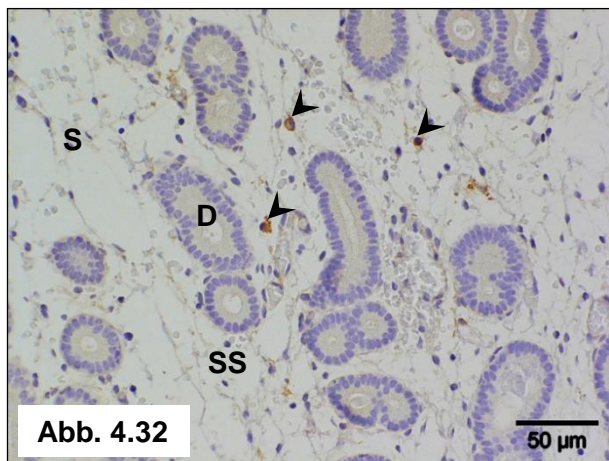


Abb. 4.32:

Endometrium, Immunhistologie, CD79A, Gruppe 4 (IUD/rLP); IUD: intrauterine device, rLP: reguläre luteale Phase

Im Stratum spongiosum sind einzelne B-Zellen (Pfeilspitze) nachweisbar; SS: Stratum spongiosum (SS); Stroma (S); Drüsen (D)

4.7.3 Plasmazellen

Zur Darstellung von Plasmazellen wurden die Biopate mittels Methylgrün-Pyronin-Färbung gefärbt und ausgewertet. Die Anzahl dieser Zellen ist insgesamt sehr niedrig, im LE wird überwiegend (29/30 Stuten) keine Infiltration mit Plasmazellen beobachtet. Diese Zellpopulation ist vermehrt im Stratum compactum nachweisbar, allerdings ist diese Beobachtung statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 4.33, S. 73, Abb. 4.34, S. 73).

Tab. 4.20: Vorkommen der Plasmazellen in den Schichten des Endometriums *mit* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (n = 30)

Plasmazellen (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vLP	4 IUD / rLP
LE	Median	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
Str. c	Median	5 (0 – 10)	2 (0 – 22)	5 (0 – 12)	5 (0 – 18)
Str. sp.	Median	1 (0 – 12)	3 (1 – 20)	2 (1 – 7)	2 (1 – 10)
Gesamt	Median	6 (0 – 23)	7 (3 – 23)	12 (1 – 14)	10 (2 – 19)

Legende zu Tab. 4.20: vergleiche Tab. 4.18, S. 70

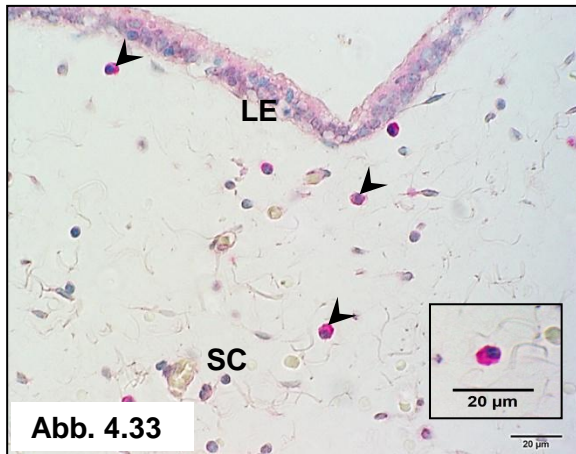


Abb. 4.33: Endometrium, Methylgrün-Pyronin-Färbung, Gruppe 3 (IUD/vlP);
IUD: intrauterine device; vlP: verlängerte luteale Phase

Im Stratum compactum (SC) finden sich einzelne Plasmazellen (Pfeilspitze);
luminale Epithel (LE)

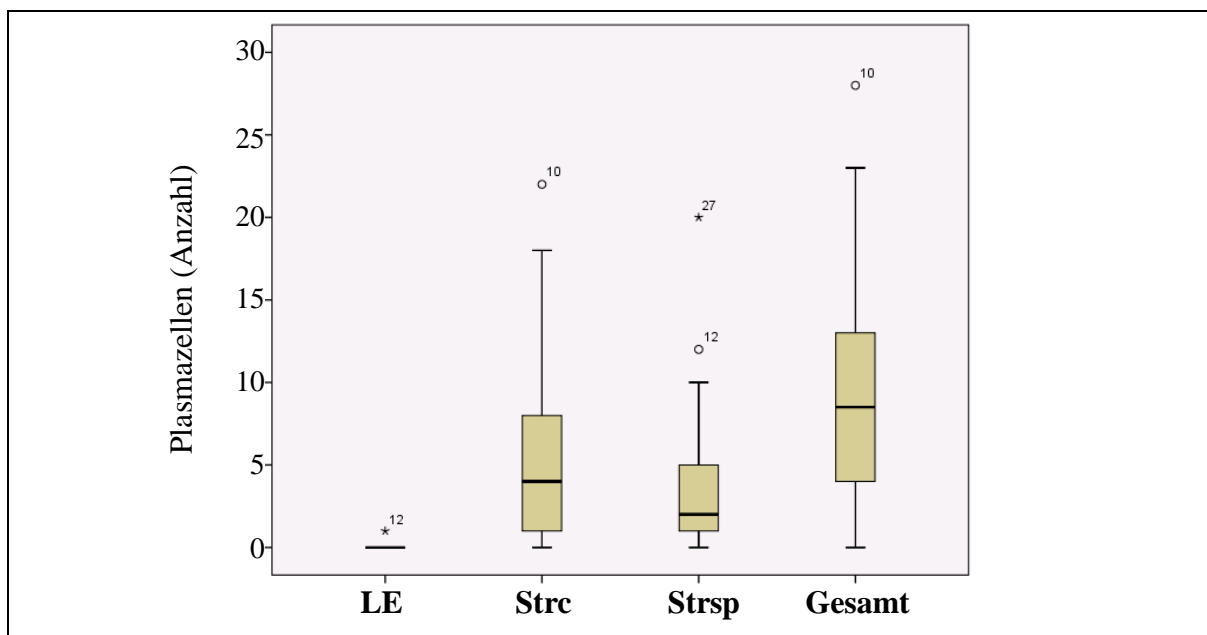


Abb. 4.34: Vorkommen der Plasmazellen in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten
ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.34: vergleiche Abb. 4.29, S. 70

4.7.3.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

In der statistischen Auswertung können keine Unterschiede zwischen den Stutengruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) ermittelt werden. Jedoch ist im Endometrium der IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) eine erhöhte Anzahl an Plasmazellen nachweisbar im Vergleich zu den KB-Stuten (Gruppe 1 und 2; vgl. Tab. 4.20, S. 72). Keine der Stuten mit einer Endometritis (nicht-eitrig, eitrig) zeigt eine vermehrte Anzahl an Plasmazellen im Stratum compactum im Vergleich zu den übrigen Versuchstieren (vgl. Abb. 4.35, S. 74), lediglich die Stute Nr. 10 ohne Endometritis (Ausreißer, vgl. Abb. 4. 34) weist eine erhöhte Anzahl an Plasmazellen auf. Im Stratum spongiosum treten vermehrt Plasmazellen bei den Stuten 12 (nicht-eitrige Endometritis) und 27 (ohne Endometritis) auf (Ausreißer/Extremwert, vgl. Abb. 4. 34). Insgesamt ist die Anzahl der Plasmazellen variabel zwischen den einzelnen Stuten und es lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermitteln.

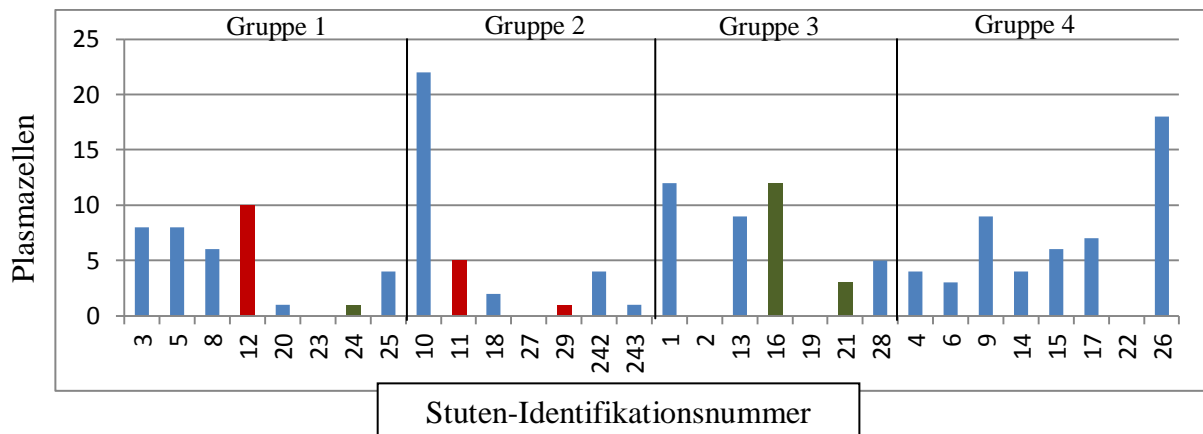


Abb. 4.35: Anzahl der Plasmazellen im Stratum compactum der Versuchstiere

Legende zu Abb. 4.35: siehe Abb. 4.27, S. 69

4.7.4 Makrophagen

Makrophagen wurden mittels Immunhistologie (Antikörper: Lysozym und MAC 387) selektiv dargestellt und ausgezählt, dabei werden in allen Proben diese Zellen nachgewiesen. Die Zellpopulation kommt bevorzugt im Stratum spongiosum vor ($p < 0,01$), dagegen finden sich keine intraepithelialen Makrophagen (vgl. Abb. 4.37, S. 75; Abb. 4.38, S. 75).

Tab. 4.21: Vorkommen der Makrophagen in den Schichten des Endometriums *mit* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit ($n = 30$)

Makrophagen (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
Str. c	Median	14 (2 – 20)	2 (0 – 4)	7 (0 – 19)	3 (0 – 12)
Str. sp.	Median	15 (5 – 22)	7 (0 – 10)	10 (2 – 27)	7 (2 – 19)
Gesamt	Median	25 (7 – 42)	8 (1 – 14)	18 (2 – 43)	10 (2 – 26)

Legende zu Tab.4.21: vergleiche Tab. 4.18, S. 70

4.7.4.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Statistisch signifikante Unterschiede sind zwischen Gruppe 1 und 2 im Stratum compactum zu ermitteln ($p < 0,0125$). In Gruppe 1 (KB/tragend) kann dabei, im Vergleich zum Endometrium der Gruppe 2 (KB/zyklisch), eine erhöhte Anzahl an Makrophagen nachgewiesen werden. Eine ähnliche Verteilung zeigt sich zwischen Gruppe 3 und 4, signifikante Unterschiede finden sich hier jedoch nicht (vgl. Tab. 4.21, S. 74; Abb. 4.39, S. 76).

Es fällt auf, dass bei zwei Stuten mit einer eitrigen Endometritis (Nr. 21, 24) neben den neutrophilen Granulozyten und einer Stute (Nr. 12) mit einer nicht-eitrigen Endometritis vermehrt Makrophagen nachweisbar sind (vgl. Abb. 4.36, S. 75). Allerdings stellen die Werte dieser Stuten (12, 21, 24) keine Ausreißerwerte im Boxplot dar und es sind ebenfalls bei Versuchstieren ohne eine Endometritis teils eine ähnliche Anzahl an Makrophagen im Stratum compactum darstellbar (vgl. Abb. 4.36, S. 75).

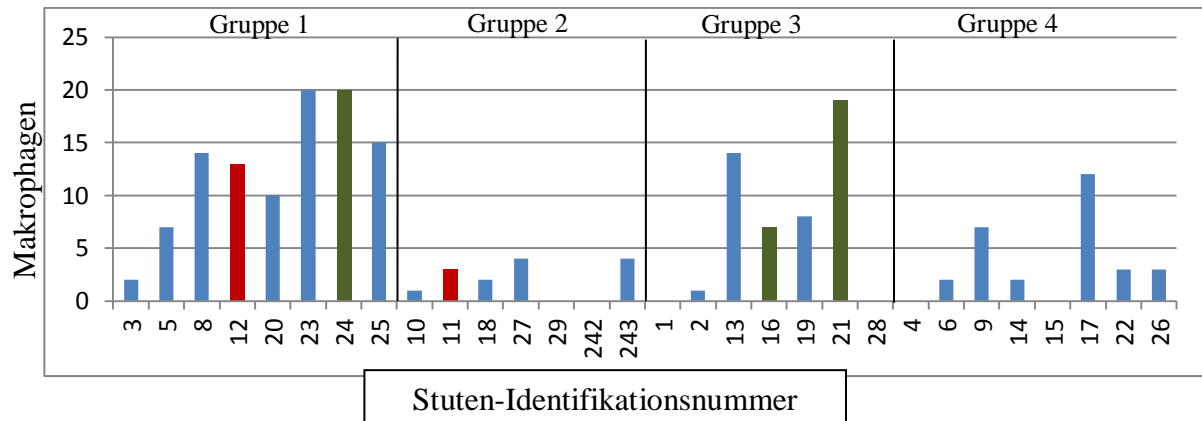


Abb. 4.36: Anzahl der Makrophagen im Stratum compactum der Versuchstiere

Legende zu Abb. 4.36: siehe Abb. 4.27, S. 69

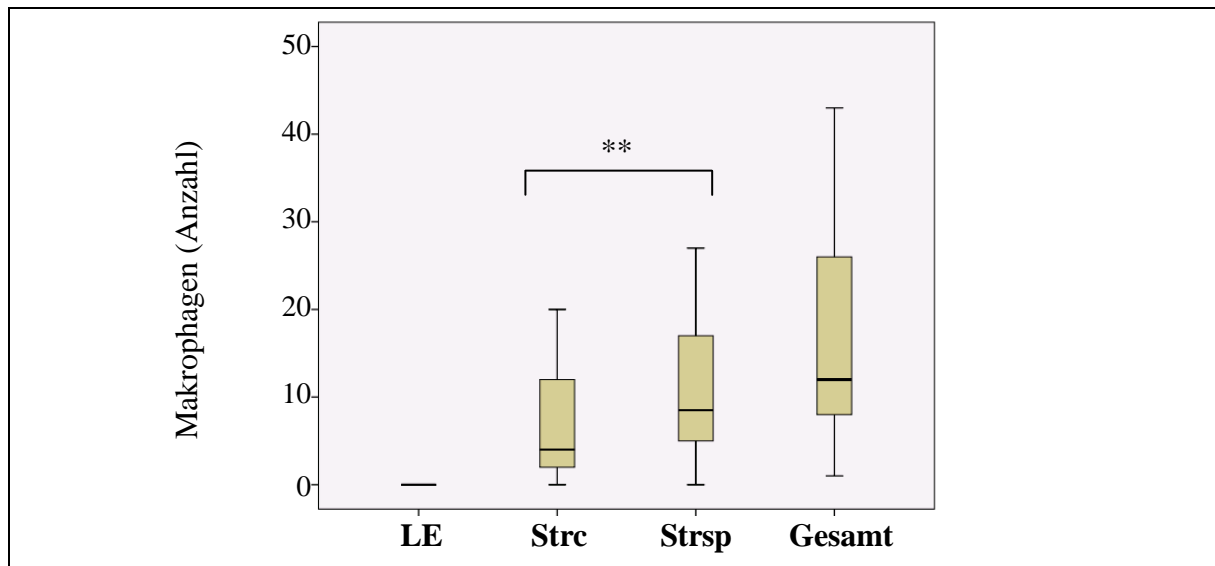


Abb. 4.37: Vorkommen der Makrophagen in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten *ohne* Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Zeichenerklärung Abb. 4.37: vergleiche Abb. 4.29, S. 70

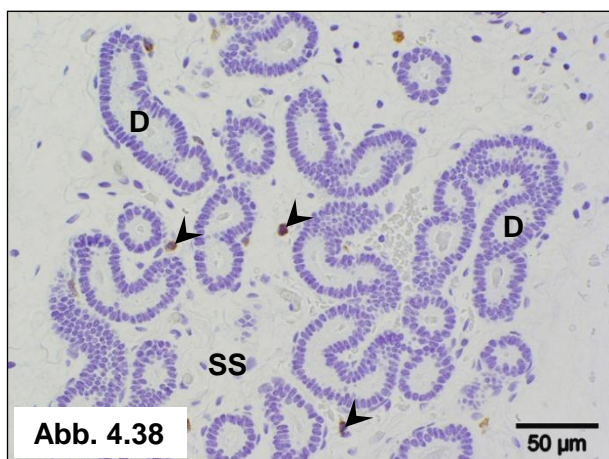


Abb. 4.38:

Endometrium, Immunhistologie, MAC 378, Gruppe 1 (KB/tragend); KB: künstlich besamt

Im Stratum spongiosum (SS) können mehrere Makrophagen (Pfeilspitzen) nachgewiesen werden; Drüse (D)

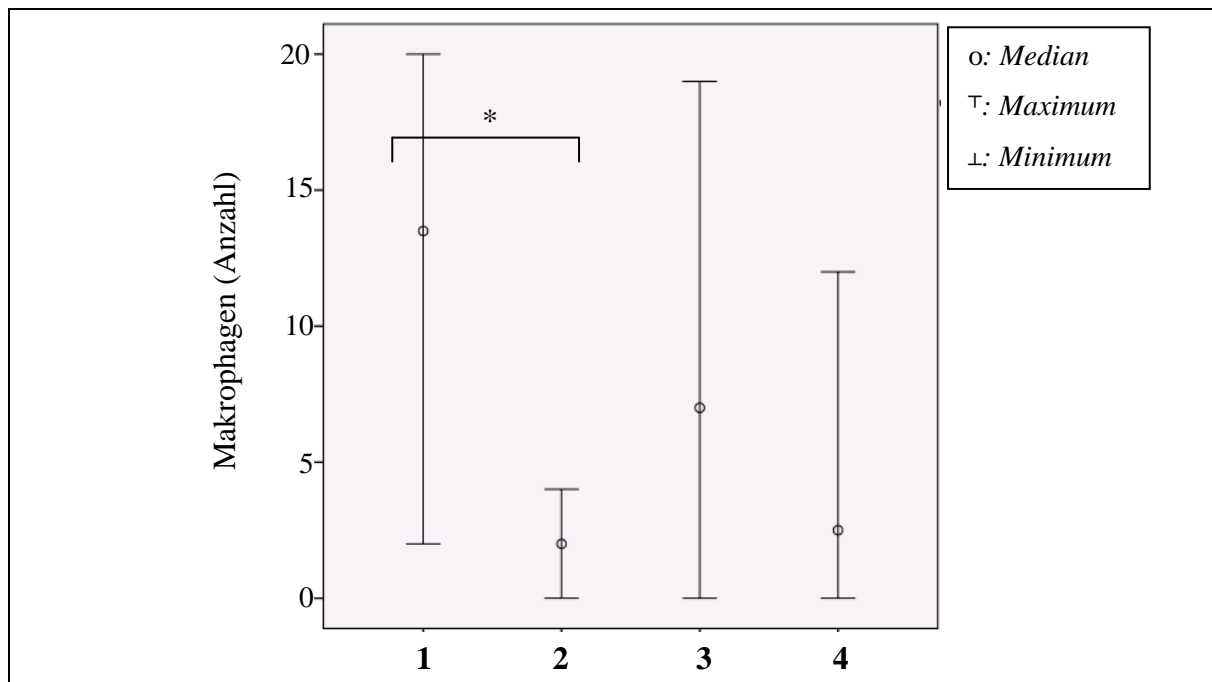


Abb. 4.39: Anzahl der Makrophagen im Stratum compactum der Stutengruppen

Legende zu Abb. 4.39: vergleiche Abb. 4.20, S. 63

4.7.5 Neutrophile Granulozyten

Zur Unterscheidung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten wurden die Biopate mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode) angefärbt (vgl. Abb. 4.40). Während zwischen den luminalen Epithelzellen keine neutrophile Granulozyten nachweisbar sind, kann diese Zellpopulation vereinzelt im Stratum compactum und Stratum spongiosum nachgewiesen werden, wobei der Unterschied hinsichtlich der Infiltration der Schichten statistisch nicht signifikant ist (vgl. Abb. 4.41, S. 77). Bei drei Stuten wurde aufgrund der Beteiligung von neutrophilen Granulozyten eine akut eitrige Endometritis diagnostiziert. Zwei dieser Stuten (Stuten-ID: 16, 21) sind der Gruppe 3 zugeordnet und eine Stute (Stuten-ID 24) gehört zu den künstlich besamten und tragenden Tieren.

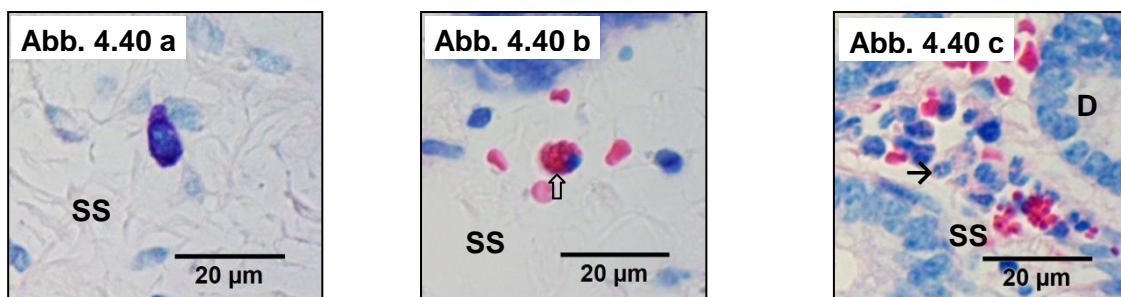


Abb. 4.40 a, b, c: Endometrium, panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode), Gruppe 4 (IUD/rIP); IUD: intrauterine device

Mastzellen (a), eosinophile Granulozyten (b, Blockpfeil) und neutrophile Granulozyten (c, Pfeil) im Stratum spongiosum (SS); Drüse (D)

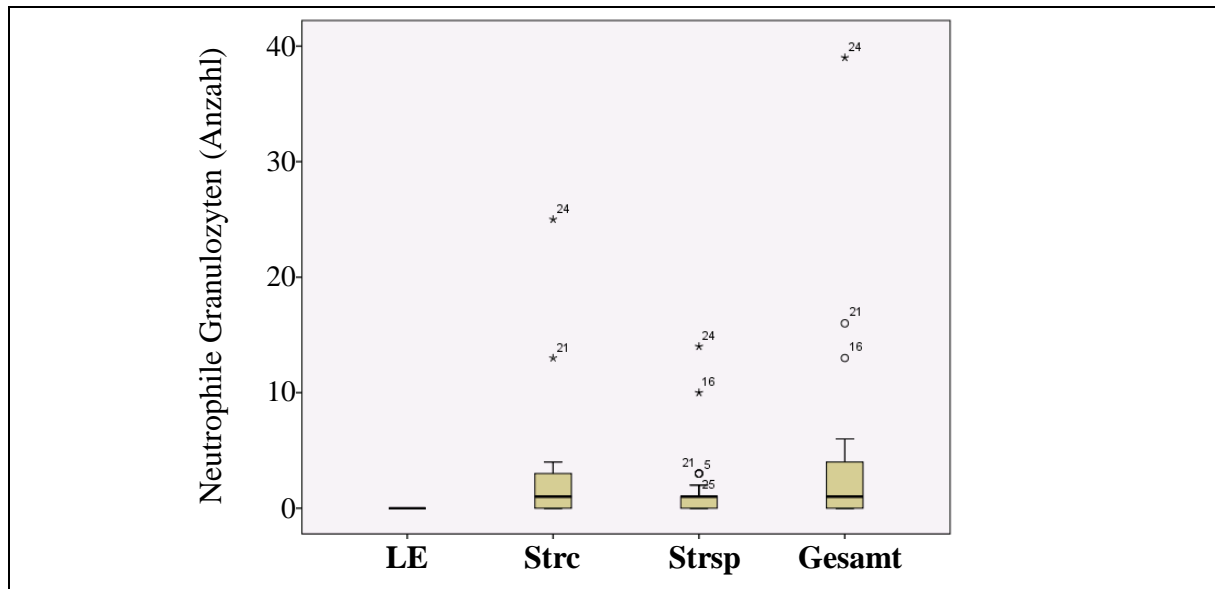


Abb. 4.41: Vorkommen der neutrophilen Granulozyten in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten **ohne** Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/ Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.41: vergleiche Abb. 4.28, S. 69

Tab. 4.22: Vorkommen der neutrophilen Granulozyten in den Schichten des Endometriums **mit** Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit ($n = 30$)

Neutrophile Gr. (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
Str. c	Median	2 (0 – 25)	1 (0 – 3)	0 (0 – 13)	1 (0 – 3)
Str. sp.	Median	1 (0 – 14)	1 (0 – 2)	1 (0 – 10)	1 (0 – 1)
Gesamt	Median	4 (0 – 39)	3 (0 – 4)	1 (0 – 16)	1 (0 – 4)

Legende zu Tab. 4.22: vergleiche Tab. 4.18, S. 70, Gr: Granulozyten

4.7.5.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Insgesamt ist bei allen Proben lediglich eine geringe Anzahl an neutrophilen Granulozyten zu finden und es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stutengruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4) nachweisbar (vgl. Tab. 4.22). Der hohe Maximalwert in Gruppe 1 und 3 ergibt sich durch drei Stuten (Nr. 16, 21, 24) mit einer eitrigen Endometritis (vgl. Kap. 4.2.1, S. 42). Dabei weist die Stute mit einer oberflächlichen eitrigen Endometritis (Nr. 21; Extremwerte im Boxplot, vgl. Abb. 4.41) eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Stratum compactum auf im Vergleich zu den übrigen Tieren (vgl. Abb. 4.42, S. 78). Dagegen befinden sich die neutrophilen Granulozyten bei der Stute Nr. 16 mit einer tiefen eitrigen Endometritis vermehrt im Stratum spongiosum (Extremwerte im Boxplot, vgl. Abb. 4.41) sowie bei dem Versuchstier Nr. 24 mit einer oberflächlichen und tiefen eitrigen Endometritis (Extremwert im Boxplot, vgl. 4. 41) sowohl im Stratum compactum und als auch im Stratum spongiosum.

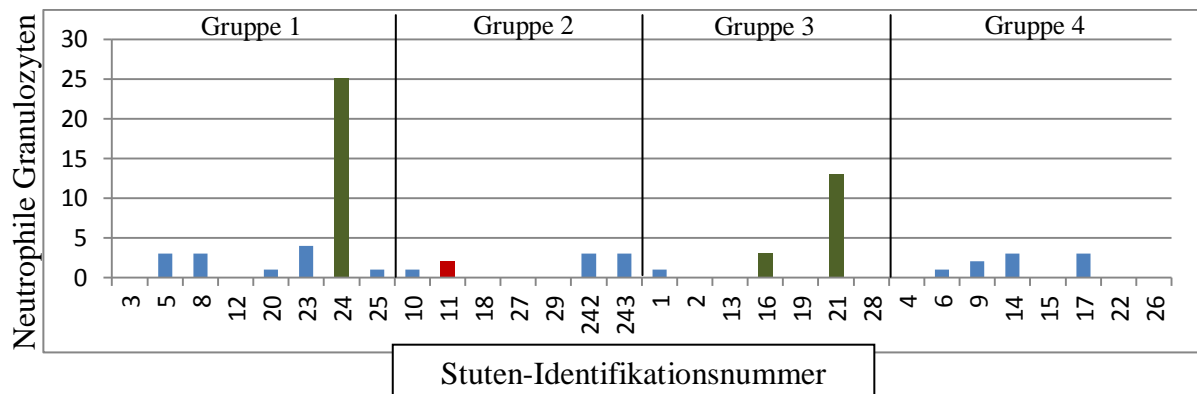


Abb. 4.42: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Stratum compactum der Versuchstiere
Legende zu Abb. 4.42: siehe Abb. 4.27, S. 69

4.7.6 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten wurden in den Biopaten mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode) dargestellt und ausgewertet. Insgesamt ist die Anzahl der eosinophilen Granulozyten sehr gering, die Zellen werden in etwa gleicher Anzahl sowohl im Stratum compactum als auch im Stratum spongiosum nachgewiesen (vgl. Abb. 4.43; Abb. 4.40, S. 76).

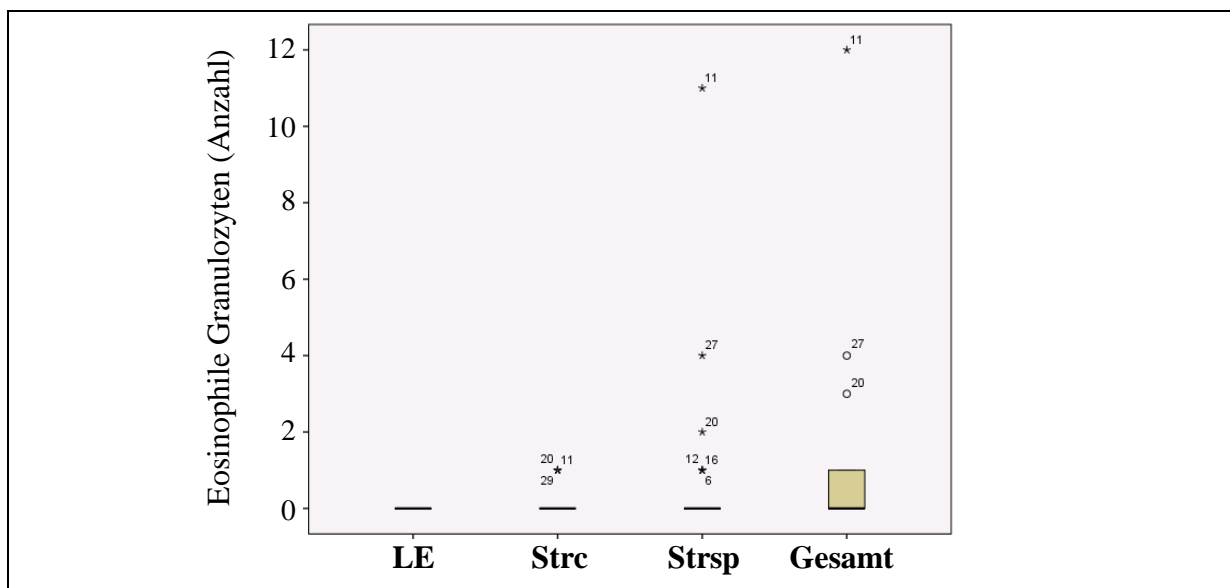


Abb. 4.43: Vorkommen der eosinophilen Granulozyten in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten **ohne** Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.43: vergleiche Abb. 4.28, S. 69

4.7.6.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Tab. 4.23, S. 79) zwischen den Stutengruppen (1/2; 1/3; 2/4; 3/4). Keine der Stuten zeigte eine Endometritis eosinophila.

Das Auftreten von eosinophilen Granulozyten wird bei der Beurteilung des Charakters (eitrig, nicht-eitrig) einer Endometritis nicht berücksichtigt. Eine vergleichende Darstellung zwischen Stuten mit und ohne Endometritis bezogen auf das Auftreten eosinophiler Granulozyten wird daher nicht vorgenommen.

Tab. 4.23: Vorkommen der eosinophilen Granulozyten in den Schichten des Endometriums mit Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit ($n = 30$)

Eos (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
Str. c	Median	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0 (0 – 1)
Str. sp.	Median	0 (0 – 1)	0 (0 – 2)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)
Gesamt	Median	0 (0 – 3)	0 (0 – 12)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)

Legende zu Tab. 4.23: vergleiche Tab. 4.18, S. 70, Eos: eosinophile Granulozyten

4.7.7 Mastzellen

Die Mastzellen wurden, wie die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, in den Biopтатаen mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode) bestimmt. Mastzellen befinden sich überwiegend im Stratum spongiosum ($p = 0,013$), im Stratum compactum wird die Zellpopulation lediglich vereinzelt nachgewiesen. Eine Infiltration des luminalen Epithels kann nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 4.44; Abb. 4.40, S. 76).

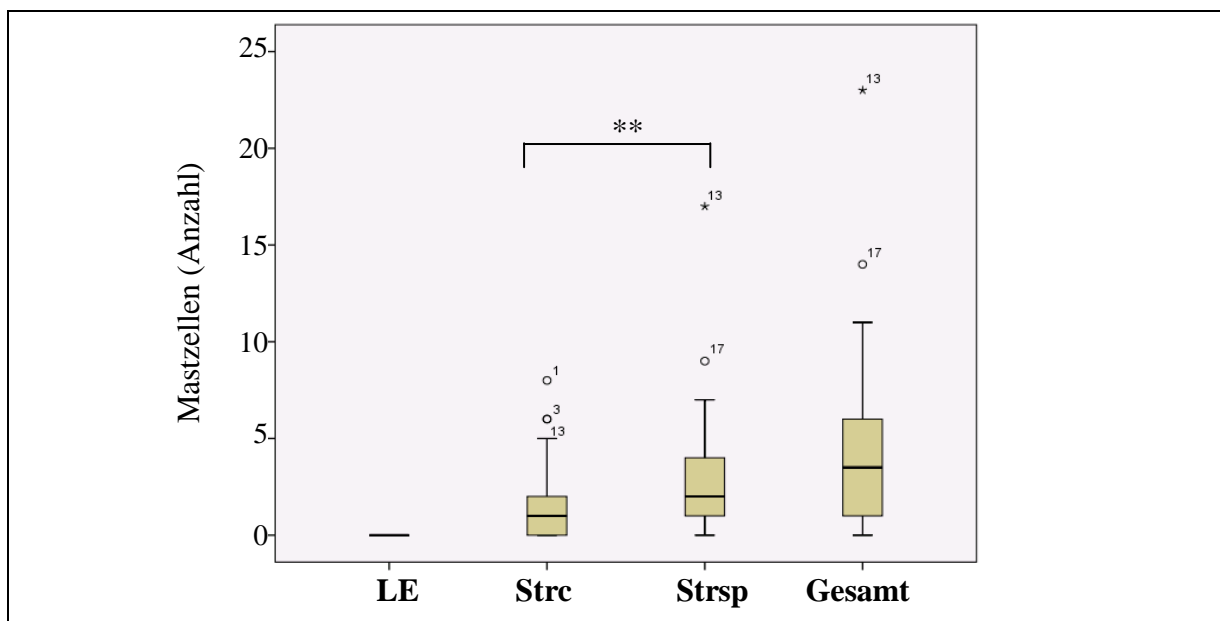


Abb. 4.44: Vorkommen der Mastzellen in den Schichten des Endometriums der 30 Stuten ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit (10 HPF/Schicht/Stute)

Legende zu Abb. 4.44: vergleiche Abb. 4.28, S. 69

4.7.7.1 Ergebnisse im Gruppenvergleich

Hinsichtlich der Mastzellichte im Stratum spongiosum und der Gesamtanzahl dieser Zellpopulation pro Biopat besteht zwischen der Versuchsgruppen 2 und 4 ein statistisch signifikanter Unterschied. Bei den künstlich besamten und zyklischen Stuten (Gruppe 2) werden signifikant weniger Mastzellen nachgewiesen als in Gruppe 4 (vgl. Abb. 4.45). Bei den übrigen Gruppenvergleichen (Mann-Whitney-U-Test, 1/2; 1/3; 3/4) sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zu ermitteln (vgl. Tab. 4.24). Das Auftreten von Mastzellen wird bei der Beurteilung des Charakters (eitrig, nicht-eitrig) einer Endometritis nicht berücksichtigt. Eine vergleichende Darstellung zwischen Stuten mit und ohne Endometritis bezogen auf das Auftreten von Mastzellen wird daher nicht vorgenommen.

Tab. 4.24: Vorkommen der Mastzellen in den Schichten des Endometriums *mit Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit* (n = 30)

Mastzellen (Min. – Max.)		Gruppe			
		1 KB / tragend	2 KB / zyklisch	3 IUD / vIP	4 IUD / rIP
LE	Median	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
Str. c	Median	1 (0 – 6)	0 (0 – 2)	1 (0 – 8)	2 (0 – 5)
Str. sp.	Median	2 (0 – 7)	1 (0 – 2)	3 (0 – 17)	4 (2 – 9)
Gesamt	Median	3 (0 – 8)	1 (0 – 4)	4 (0 – 23)	6 (2 – 14)

Legende zu Tab. 4.24: vergleiche Tab. 4.18, S. 70

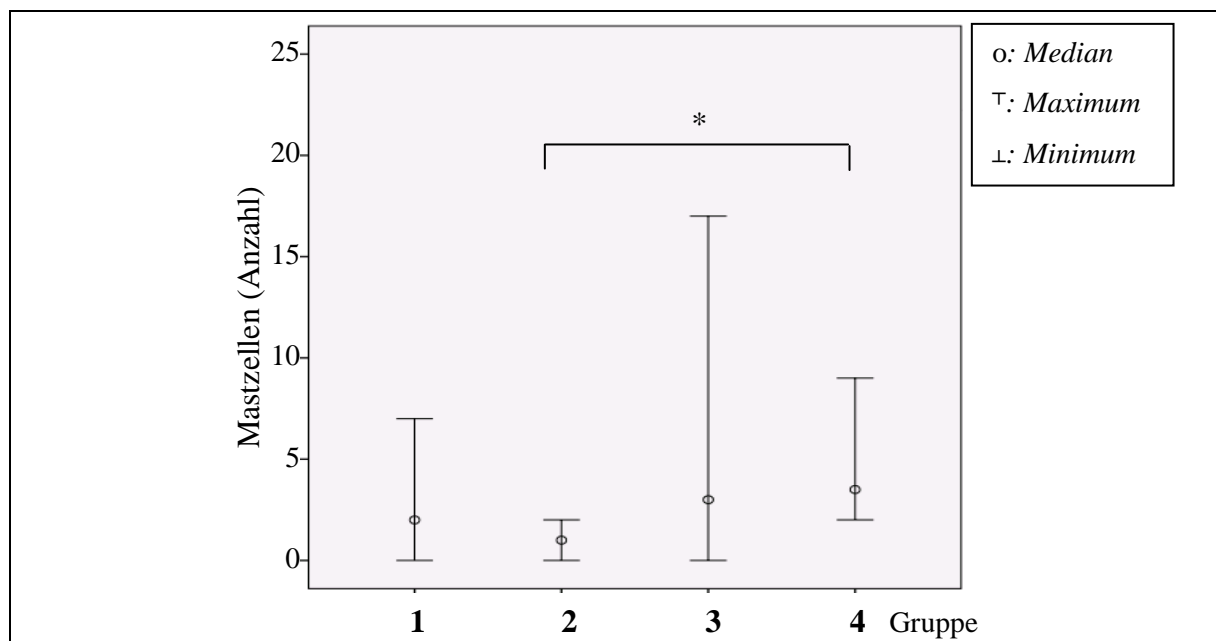


Abb. 4.45: Anzahl der Mastzellen im Stratum spongiosum der Versuchsgruppen

Legende zu Abb. 4.45: vergleiche Abb. 4.20, S. 63

4.7.8 Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich der Auszählung der Entzündungszellpopulationen

Die **Verteilung der Entzündungszellen** in den verschiedenen endometrialen Schichten variiert zwischen den Zellpopulationen, eine Übersicht gibt Tab. 4.25.

Tab. 4.25: Verteilung der Entzündungszellen in den endometrialen Schichten

Entzündungszellen	
Art	Verteilung in (n=30)
T-Lymphyten	LE < Str.c > Str.sp
B-Lymphozyten	LE \ominus ; Str. c = Str. sp
Plasmazellen	LE \ominus ; Str. c = Str. sp
Makrophagen	LE \ominus ; Str. c < Str. sp
Neutrophile Granulozyten	LE \ominus ; Str. c = Str. sp
Eosinophile Granulozyten	LE \ominus ; Str. c = Str. sp
Mastzellen	LE \ominus ; Str. c < Str. sp

Legende zu Tab. 4.24: = gleichmäßige Verteilung zwischen den Schichten, \ominus keine Zellen in dieser Schicht, >/< Anzahl größer/kleiner, fettgedruckt: statistisch signifikant mehr Zellen, Str. c.: Stratum compactum; Str. sp.: Stratum spongiosum; LE: luminales Epithel

Die zuvor semiquantitativ gestellte histopathologische Diagnose einer **Endometritis** (vgl. Tab. 4.3, S. 42), konnte durch die Auszählung (quantitativ) der verschiedenen Entzündungszellen bestätigt werden.

Eine chronische nicht-eitrige Endometritis konnte lediglich bei KB-Stuten (Nr. 12: tragend; 11, 29: zyklisch) diagnostiziert werden, dabei sind T-Lymphozyten im Stratum compactum die dominierende Zellpopulation. Daneben lassen sich bei diesen Stuten mononukleäre Infiltrationen (B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen) nachweisen.

Bei den Stuten mit einer eitrigen Endometritis (Nr. 16, 21: IUD/P; 24: KB/tragend) ist im Endometrium, im Vergleich zu den übrigen Versuchstieren, eine vermehrte Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nachweisbar. Die Auszählung (quantitativ) bestätigt in diesem Zusammenhang die bereits mittels Histopathologie gestellte Diagnose (semiquantitativ) einer eitrigen Endometritis.

Bei dem Vorliegen einer oberflächlichen Entzündung (Nr. 11: KB/zyklisch; 12, 29: KB/tragend; 21: IUD/P) treten die Zellen überwiegend im Stratum compactum auf. Bei tiefer gelegenen Endometritiden, wie es bei der Stute Nr. 16 (IUD/P) der Fall ist, sind die Entzündungszellen vorwiegend im Stratum spongiosum lokalisiert. Bei der Stute Nr. 24 (KB/tragend) kann sowohl im Stratum compactum als auch im Stratum spongiosum eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen nachgewiesen werden.

In der Gruppe 4 (IUD/N) zeigt sich weder in histopathologischen Auswertung noch bei der Auszählung eine vermehrte Anzahl an Entzündungszellen im Vergleich zu den übrigen Versuchstieren.

Zwischen den **KB-Stuten** (Gruppe 1 und 2) ist ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Makrophagen nachweisbar, dabei ist die Makrophagen-Dichte der künstlich besamten und tragenden Stuten im Vergleich zu den künstlich besamten und zyklischen Stuten höher.

Zwischen den **IUD-Stuten** (Gruppe 3 und 4) sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zu ermitteln, allerdings weisen die IUD-Stuten mit verlängerter lutealer Phase (Gruppe 3) eine dezent höhere Anzahl an Makrophagen sowie weniger B-Lymphozyten im Vergleich zu den IUD-Stuten mit regulärer lutealer Phase (Gruppe 4) auf. Die Anzahl an Makrophagen in der Gruppe 3 wird dabei überwiegend durch die zwei Stuten mit einer eitrigen Endometritis erreicht (vgl. Abb. 4.36, S. 75). Der Unterschied der B-Lymphozyten Anzahl zwischen den zwei Gruppen wird nicht durch die Versuchstiere mit einer Endometritis beeinflusst.

Die **IUD-Stuten** sind im Vergleich zu den **KB-Stuten** durch eine geringfügig höhere Anzahl an T-Lymphozyten (luminale Epithel, vgl. Tab. 4.18, S. 70) und Plasmazellen gekennzeichnet, allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Die Stuten mit einer Endometritis, entsprechend erhöhter Anzahl an Entzündungszellen im Endometrium, verursachen dabei im Bezug auf T-Lymphozyten und Plasmazellen keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede (vgl. Abb. 4.35, S. 74). Die Mastzellen treten bei den IUD-Stuten im Vergleich zu den KB-Stuten vermehrt auf, dabei ist der Unterschied zwischen Gruppe 2 (KB/zyklisch) und 4 (IUD/rIP) statistisch abgesichert.

5 DISKUSSION

5.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es:

- mittels histomorphologischer und immunhistologischer Untersuchungen die Auswirkungen von intrauterinen Plastikbällen („small uterine devices“) auf das equine Endometrium darzustellen, sowie die erhobenen Befunde mit den Ergebnissen am equinen Endometrium künstlich besamter, zyklischer und tragender Stuten zu vergleichen. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll somit der zugrundeliegende Wirkmechanismus der Plastikbälle, der eine Verlängerung der lutealen Phase/Rosseunterdrückung nach Einsatz auslösen kann, erforscht werden,
- in diesem Zusammenhang die in der Literatur diskutierten Hypothesen hinsichtlich des Wirkmechanismus der IUDs bei Pferden, wie eine Scheinträchtigkeit und eine Induktion einer geringgradig chronischen Endometritis zu überprüfen,
- mittels oben genannter vergleichender Untersuchungen von den tragenden Stuten und IUD-Stuten mögliche Rückschlüsse auf das ursprüngliche Signal zur maternalen Trächtigkeitserkennung zu ziehen.

5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit stand ein Material von insgesamt 30 Endometriumbiopsaten und Serumproben von Stuten der Universitätskliniken aus Helsinki und Hannover zur Verfügung, um die Auswirkungen der Plastikbälle zu untersuchen. Diese Stuten wurden regelmäßig allgemein und klinisch-gynäkologisch sowie ultrasonographisch von den Tierärzten der Reproduktionseinheiten untersucht, wodurch gewährleistet werden konnte, dass die Tiere klinisch-gynäkologisch gesund sind. Die Pferde wurden zuvor in gynäkologischen Lehrveranstaltungen sowie zu weiteren Forschungsprojekten der Universitäten eingesetzt. Aus diesem Grund können reaktive Alterationen des Endometriums abschließend nicht ausgeschlossen werden, da überdurchschnittlich häufig rektale und vaginale Untersuchungen durchgeführt wurden und diese Manipulationen die Rezeptorexpression im Endometrium der Stute beeinflussen können (TOMANELLI et al. 1991, WATSON et al. 1992, ÖZGEN et al. 2002, KALPOKAS et al. 2010). Jedoch konnten weder klinisch noch histologisch in den Biopsaten diesbezüglich auffällige Befunde ermittelt werden.

Die IUDs werden in der Praxis bei Stuten mit einer stark ausgeprägten und andauernden Rosesyndromatik eingesetzt. Da sich diese Problematik bei den Versuchstieren nicht zeigt, entsprechen die Stuten, wie schon von ARGO und TURNBULL (2010) angemerkt, möglicherweise nicht einer geeigneten Versuchsgruppe. Durch die Einteilung der Pferde in vier Gruppen ist die Tieranzahl der pro Gruppe relativ niedrig (< 9 Tiere/Gruppe), daher sollten für weitere statistisch validierte Aussagen bezüglich der histomorphologischen und immunhistologischen Befunde in Folgearbeiten nach Möglichkeit mehr Versuchstiere eingesetzt werden.

Die Endometriumbiopsate wurden im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig in einem Blind-Versuch hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit mikroskopiert und befundet, um Einflüsse durch den Versuchsauswerter (Veronika Klein, geb. Walzl) auszuschließen. Über die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression endometrialer Proteine und Rezeptoren sowie des Ki-67 Antigen und des Enzyms COX2 existieren in der zugänglichen Literatur Angaben bei zyklischen und graviden Stuten (RAILA et al. 1997, GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, BOERBOOM et al. 2004), allerdings sind keine immunhistologischen Studien zu Stuten mit IUDs bekannt. An dem vorliegenden Material konnten daher erstmals vergleichende histomorphologische und immunhistologische Untersuchungen zwischen zyklischen/graviden Stutenendometrien und IUD-Stuten durchgeführt werden.

5.3 Abschließende Betrachtung der Resultate

5.3.1 KB-Stuten

Die Ergebnisse der Gruppe 1 (KB/tragend) und der Gruppe 2 (KB/zyklisch) bestätigen die in der Literatur bekannten Beobachtungen.

Dazu zählt bei den graviden KB-Stuten die Blockierung der Cyclooxygenase 2 durch den Embryo (BOERBOOM et al. 2004, ATLI et al. 2010, EALY et al. 2010), eine hohe Progesteronkonzentration infolge eines Copus luteum graviditatis (ALLEN 2001), ein charakteristisches Proteinexpressionsmuster (ELLENBERGER et al. 2008), weniger pathohistologische Veränderungen im Endometrium im Vergleich zu den Stuten der Gruppe 2 und folglich eine bessere Kategorisierung (KENNEY und DOIG 1986, SCHOON et al. 1992) sowie das typische Expressionsverhalten der Östrogen- und Progesteronrezeptoren (TOMANELLI et al. 1991, RAILA et al. 1997, MCDOWELL et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, HARTT et al. 2005) und des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen (GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, ÖZGEN et al. 2002). Zudem sind die tragenden Stuten jünger im Vergleich zu den zyklischen KB-Stuten, übereinstimmend mit den Angaben, dass mit fortschreitendem Alter die Abfohrate bei Stuten abnimmt (EVANS et al. 1987, LIU 1988). Die eigenen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass Makrophagen im Endometrium während der Trächtigkeit im Vergleich zum zyklischen Endometrium vermehrt auftreten. BRUNCKHORST et al. (1991) vermuten eine progesteronabhängige Migration der Zellen in das Endometrium. Bei Menschen (KORTE et al. 1993), Ratten (VAN et al. 1992) und Schafen (HANSEN 2007) treten Makrophagen während der Trächtigkeit vermehrt im Endometrium auf. Es wird vermutet, dass diese die Immunreaktion der Mutter gegen den Embryo (Allograft) abschwächen (MUNN et al. 1999). Folglich erscheint die Migration der Makrophagen in das equine Endometrium der graviden KB-Stuten auch im eigenen Untersuchungsmaterial durch den Embryo, zusammen mit den hohen Progesteronwerten, verursacht zu sein. Nach Angaben von LYLE (2012) variiert das Auftreten von Makrophagen-Subpopulationen im equinen Endometrium je nach Zyklusstand, Trächtigkeit und bei entzündlichen Reaktionen. Weitere Studien zur Charakterisierung der Makrophagen-Subpopulationen im equinen Endometrium sind unter diesem Gesichtspunkt anzustreben.

Die KB-Stuten, nicht tragend (Gruppe 2) sind älter, zeigen öfter pathohistologische Alterationen (Endometrose, teils destruierend; Angiosklerose) und werden demzufolge häufiger in die Kategorie IIb/III eingeordnet im Vergleich zu den Versuchstieren der Gruppe 1. Eine COX2-Expression ist ebenso nachweisbar (BOERBOOM et al. 2004, ATLI et al. 2012) wie sinkende Progesteronwerte infolge einer Luteolyse (ADAMS und BOSU 1988, GINTHER 1992, AURICH 2011), dies entspricht den Literaturangaben. Gemäß dem Zyklusstand ändert sich die Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression (AUPPERLE et al. 2000), die Ki-67 Antigen-Expression (GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, ÖZGEN et al. 2002) sowie die Proteinsekretion innerhalb des Endometriums (ELLENBERGER et al. 2008, HOFFMANN et al. 2009a). Hinsichtlich der Entzündungszellen treten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (tragend/nicht tragend) auf, ausgenommen bezüglich der Infiltration mit Makrophagen (S. 84). Trotzdem können die Ergebnisse der zellulären Infiltration des Endometrium bereits vorhandene Literaturangaben bezüglich Vorkommen, Verteilung und zyklusassozierten Schwankungen bestätigen. Zum Beispiel wurden T-Lymphozyten in allen Proben sowie in sämtlichen Schichten des Endometriums nachgewiesen, wobei die Infiltration überwiegend im Stratum compactum lokalisiert ist (KENNEY 1978, WATSON und DIXON 1993, BEUKE 2001). Die Anzahl von Lymphozyten unterliegt keinen zyklusassozierten Schwankungen (WATSON und STOKES 1988, WATSON und THOMSON 1996), so dass auch im eigenen Tiergut in der Gruppe 2, im Vergleich zu Gruppe 1, trotz uneinheitlicher Hormonwerte, keine Unterschiede in der Lymphozytendichte feststellbar sind. Die Anzahl dieser Zellen steigt bei dem Vorliegen einer chronischen Entzündung im Endometrium (WATSON und STOKES 1988, WATSON und THOMSON 1996), so wurde bei drei KB-Stuten mit einer chronische Endometritis ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Lymphozyten nachgewiesen. Die Dichte der B-Lymphozyten wird in der Literatur bei genital gesunden Stuten als insgesamt gering und zyklusunabhängig angegeben (WATSON und THOMSON 1996) und stimmt mit den eigenen Ergebnissen überein, sowie die Angabe, dass Plasmazellen im equinen Endometrium vermehrt im Stratum compactum nachweisbar sind (WAECHLI und WINDER 1991). Im Endometrium der Stuten treten neutrophile Granulozyten physiologisch im Östrus auf, jedoch nicht im Interöstrus (BRUNCKHORST et al. 1991, BEUKE 2001). Dies erklärt die geringe Anzahl dieser Zellen in den eigenen Biopsien, welche im Interöstrus gewonnen wurden. Im Endometrium der Stute wird das Vorkommen von wenigen eosinophilen Granulozyten als physiologisch betrachtet (KENNEY 1978, BRUNCKHORST et al. 1991, BEUKE 2001, BLÜTHGEN 2003). Progesteron eine hemmende Wirkung auf die Migration dieser Zellen (BRUNCKHORST et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit kann lediglich eine geringe Anzahl von eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Da alle Proben an Tag 15 p.ov. entnommen wurden und vorab hohe Progesteronwerte im Blut vorlagen (ADAMS und BOSU 1988), ist eine Hemmung der Migration dieser Zellpopulation in das Endometrium denkbar. In Übereinstimmung mit SCHULZ (1997), BEUKE (2001) und QUETIN (2001) befinden sich Mastzellen in den Proben der vorliegenden Studie überwiegend im Stratum spongiosum.

5.3.2 IUD-Stuten

In der Literatur werden zwei Hypothesen hinsichtlich des Wirkmechanismus intrauteriner Bälle diskutiert: 1. eine Scheinträchtigkeit, ausgelöst durch die Imitation eines Embryos durch den Ball und 2. eine geringgradige mechanisch induzierte chronische Endometritis, verursacht durch den Plastikball. Desweiteren kann ein Placeboeffekt bei den Besitzern ohne eine unmittelbare Wirkung der IUDs nicht ausgeschlossen werden (HOLM und JESPERSEN 2003, MEYER 2003, NIE et al. 2003a, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008, ARGO und TURNBULL 2010). Eine Wirkung der IUDs, die ausschließlich auf einem *Placeboeffekt* bei den Besitzern beruht, kann nahezu abgelehnt werden, da die Expression der Proteine und COX2 in den IUD-Stuten im Vergleich zu den KB-Stuten signifikante Unterschiede aufweist. Da im eigenem Untersuchungsgut zwischen den tragenden Stuten der Gruppe 1 und den IUD-Stuten der Gruppe 3 (vIP)/„Scheinträchtigkeit“ ein signifikant unterschiedliches Expressionsverhalten hinsichtlich des Enzyms COX2 und des Proteins UF besteht, kann die Hypothese einer *Scheinträchtigkeit* angezweifelt werden. Während der Trächtigkeit ist die COX2-Expression blockiert (BOERBOOM et al. 2004, ATLI et al. 2010, EALY et al. 2010), jedoch kann in der Gruppe 3 eine deutliche COX2-Expression nachgewiesen werden. Somit ist die Hypothese der „Scheinträchtigkeit“ durch IUDs als unwahrscheinlich anzusehen. Demnach ist die mechanische Stimulation mit hoher Wahrscheinlichkeit auch nicht das alleinige Signal zur equinen maternalen Trächtigkeitserkennung.

In der vorliegenden Arbeit kann ebenfalls die zweite Hypothese, eine induzierte geringgradige *chronische Endometritis*, nicht bestätigt werden. So konnte weder mit der semiquantitativen histopathologischen Auswertung noch mit der Auszählung der Entzündungszellen eine chronische Endometritis bei den IUD-Stuten nachgewiesen werden. Lediglich zwei Stuten der Gruppe 3 wiesen eine akut eitrige Endometritis auf. Diese vermehrte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten ist allerdings gruppenspezifisch nicht statistisch signifikant. Ein Einfluss dieses Befundes kann dementsprechend nicht sicher mit dem Einsatz der IUDs in Verbindung gebracht werden.

Bekannt ist bis heute, dass die IUDs eine Verlängerung der lutealen Phase (hoher Progesteronwert) verursachen und auf diese Weise die übermäßige Rossesymptomatik unterdrücken, allerdings ist die *Effizienz* der IUDs variabel, von 0% bis 75% (NIE et al. 2003, RIVERA DEL ALAMO et al. 2008). Die eigenen Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die luteale Phase bei 47 % (7/15) der Stuten durch IUDs verlängert wird (Gruppe 3: IUD/vIP). Diese Stuten (Gruppe 3) weisen, durch den Erhalt des Gelbkörpers, signifikant höhere *Progesteronwerte* auf im Vergleich zu den Versuchstieren der Gruppe 4 (IUD/rIP), bei welchen trotz Einsatz eines IUDs eine Luteolyse ausgelöst wird.

Gründe für die variable *Effektivität* der IUDs sind bisher unbekannt. Diese ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass der exakte Wirkmechanismus der intrauterinen Bälle bis heute noch ungeklärt ist und daher bisher keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden kann, ob

der Einsatz dieser Methode eventuell lediglich bei bestimmten Stuten (z.B. abhängig vom Hormonstatus, Häufigkeit der Trächtigkeit, Vorliegen endometrialer Veränderungen) effektiv ist. Die IUD-Stuten mit verlängerter lutealer Phase (IUD-P) im eigenem Tiergut zeigen, übereinstimmend mit den Befunden von NIE et al. (2003), ein geringeres Alter (eigene Studie: Median 7 Jahre) als die IUD-Tiere mit regulärer lutealer Phase (eigene Studie: Median 11 Jahre). Zudem ist der Befund einer gänzlichen Unwirksamkeit der IUDs bei den sehr jungen Stuten (Mittelwert 4,6 Jahre) von ARGO und TURNBULL (2010) zu beachten. Diese Ergebnisse lassen somit die Vermutung zu, dass die Wirksamkeit der IUDs abhängig von dem Alter der Tiere ist.

NIE et al. (2003) beobachten zusätzlich, dass die jüngeren Stuten (Mittelwert: 6,3 Jahre) die Bälle eher aus dem Uterus auswerfen als ältere (Mittelwert: 10,9 Jahre). Dies könnte auf eine erhöhte Kontraktilität des Uterus der jüngeren Tiere hindeuten. Auch bei dem Einsatz von IUDs bei der Frau ist eine altersabhängige Expulsion bekannt (WHO 1968). In der vorliegenden Arbeit blieben die IUDs nach dem Einsatz in allen Fällen innerhalb der Gebärmutter.

Zudem weisen die IUD-P-Tiere geringere Angiopathien als IUD-N-Tiere auf. Unter Umständen ist ein intaktes uterines vaskuläres System und somit eine ausreichende Perfusion des Endometriums für die Wirksamkeit der IUDs notwendig. Uterine Angiopathien treten bei der Stute vor allem trächtigkeitsassoziiert auf und sind nur indirekt altersassoziiert (SCHOON et al. 1999, AUPPERLE 2003). Da der Reproduktionsstatus jedoch im eigenen Untersuchungsgut unbekannt ist, ist eine Überprüfung dieses Zusammenhangs nicht möglich. Eine teils altersassoziierte Zunahme der Angiosklerose (GRÜNINGER 1996) ist möglicherweise Ursache für die mittelgradigen Gefäßveränderungen in der Gruppe 4, da die Stuten dieser Gruppe, im Vergleich zu der Gruppe 3, ein höheres Alter aufweisen.

Die Ausprägung der Endometrose zeigt insgesamt eine heterogene Verteilung des Schweregrades bei den IUD-Stuten und spielt somit wahrscheinlich keine bedeutende Rolle für die Effektivität einer Rosseunterdrückung mittels der IUDs. Ebenfalls eine heterogene Verteilung weisen die IUD-Stuten in der Kategorisierung (Kat. I-III) auf, dies ist insbesondere auf die unterschiedliche Ausprägung der Endometrose zurückzuführen, da der Befund maßgeblich zur Einteilung in eine Kategorie beiträgt (vgl. Kap. 2.4.3, S. 20f). Die anamnestischen und histomorphologischen Resultate der IUD-Stuten weisen demnach darauf hin, dass die Gefäßalterationen sowie das Alter einen möglichen Einfluss auf die Wirksamkeit der IUDs besitzen könnten.

Hinweise auf mögliche *Wirkmechanismen* der IUDs geben die Auszählung der Entzündungszellen im Endometrium sowie die Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse.

Lymphozyten (T-, B-Lymphozyten) und Plasmazellen sind an der spezifischen Abwehr beteiligt (WELSCH 2006). Es können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Schlußfolgernd wird das spezifische Immunsystem nicht durch IUDs aktiviert und ist folglich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Wirkung der IUDs beteiligt.

Neutrophile Granulozyten wirken an der akuten, unspezifischen Abwehrreaktion (WELSCH 2006) mit und spielen hinsichtlich der eigenen Befunde (nur vereinzelt, keine Gruppenunterschiede) ebenfalls keine erkennbare Rolle für die IUD-Wirkung. Eventuell ist das vereinzelte Auftreten der Zellen in der Gruppe 3 hinweisend auf eine erhöhte Empfindlichkeit des Endometriums gegenüber entzündliche Prozesse („susceptible mares“).

Makrophagen sind, ebenso wie die neutrophilen Granulozyten, an der unspezifischen Abwehr sowie bei Fremdkörperreaktionen beteiligt (LIEBICH 2004). Diese Zellpopulation tritt in den Spätphasen der akuten sowie bei chronischen Entzündungen auf und ist im Gewebe langlebiger im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten (WELSCH 2006). In der Gruppe 3 (IUD/vIP) ist eine höhere Anzahl an Makrophagen nachweisbar als in der Gruppe 4 (IUD/ rIP). Dies lässt vermuten, dass Makrophagen mitverantwortlich sind für die Wirkung der IUDs. Es ist aus der Humanmedizin bekannt, dass eine Fremdkörperreaktion, bestehend aus Makrophagen als Folge eines Einsatzes von medizinischen Implantaten, hervorgerufen wird (ANDERSON et al. 2008). IUDs stellen einen Fremdkörper im Uteruslumen dar und könnten somit vergleichbare Reaktionen hervorrufen. Ob die Makrophagen im Endometrium der IUD-Stuten mit verlängerter lutealer Phase aufgrund des hohen Progesteronspiegels, einer möglichen Scheinträchtigkeit oder einer unspezifischen Abwehrreaktion (Fremdkörper) auftreten, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Jedoch erscheint, unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer IUD-Studien bei der Frau und anderen Tierarten (SAGIROGLU und SAGIROGLU 1970, MARTIN und BROWN 1973), eine Fremdkörperreaktion am wahrscheinlichsten.

Mastzellen sowie eosinophile Granulozyten sind an Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt (WELSCH 2006) und lassen sich im eigenen Material bei IUD-Stuten lediglich in einer geringen Anzahl nachweisen. Eine allergene Wirkung der IUDs ist somit unwahrscheinlich. Insgesamt sprechen die eigenen Ergebnisse der Entzündungszellinfiltration für eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch die IUDs, am ehesten passend zu einer Fremdkörperreaktion. Ob dies Teil des Wirkmechanismus der IUDs oder aber lediglich einen Nebenfund darstellt, kann in der eigenen Arbeit abschließend nicht sicher geklärt werden.

Die immunhistologischen Ergebnisse der COX2-Expression der IUD-Stuten weisen auf eine Beteiligung des Enzyms bei der Wirkung von IUDs hin. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der COX2-Expression und der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion (BOERBOOM et al. 2004). Das $\text{PGF}_{2\alpha}$ bindet an die entsprechenden Rezeptoren der ovariellen Luteinzellen und führt zur Regression (Luteolyse) des Gelbkörpers (ADAMS und BOSU 1988, GINTHER 1992, AURICH 2011). Dementsprechend zeigen die Stuten der Gruppe 4 (IUD/rIP), die ebenfalls eine sinkende Progesteronkonzentration durch die Regression des Corpus luteum aufweisen, eine deutliche COX2-Expression. Jedoch ist der COX2-Nachweis statistisch signifikant stärker in der Gruppe 4 (IUD/rIP) als in der Gruppe 2 (KB/zyklisch). Dies ist möglicherweise nicht ausschließlich auf die Luteolyse zurückzuführen. Die Stuten der Gruppe 3 (IUD/vIP) zeigen trotz fehlender Luteolyse ebenfalls eine COX2-Expression. Es ist eine zusätzliche Induktion des

Enzyms COX2 durch einen weiteren Stimulus mit nachfolgender $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion in Betracht zu ziehen. Zu solchen Stimuli (vgl. Abb. 5.1, S. 92) gehören proinflammatorische Zytokine, Hormone und mechanische Traumata (SIRIOIS et al. 1992, JONES et al. 1993, SMITH et al. 1996).

Die IUDs könnten durch eine direkte *mechanische Irritation* der Uterusschleimhaut das Enzym stimulieren, jedoch konnte keine reaktive Proliferation der Schleimhaut nachgewiesen werden (Ki-67 Antigen), so dass die mechanische Irritation vermutlich lediglich dezente submikroskopische/funktionelle Auswirkungen besitzt.

Ebenfalls ist eine *hormonelle Induktion* durch einen extrauterinen Effekt der IUDs, der die Hypothalamus-Hypophysen-Achse beeinflusst, wie bei Kaninchen und Wiederkäuern nachgewiesen (JANAKIRAMAN und CASIDA 1968, BHALLA und CASIDA 1970), denkbar. Auch bei der Frau wurden abweichende Oxytocin-Werte nach dem Einsatz von IUDs ermittelt (CORFMAN und SEGAL 1968). In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich die Serumwerte und die endometrialen Rezeptoren von Progesteron und Östrogen untersucht. Die Konzentration der Steroidhormonrezeptoren im equinen Endometrium wird durch Östrogen stimuliert und durch Progesteron gehemmt (TOMANELLI et al. 1991). In diesem Zusammenhang zeigen die Stuten der Gruppe 3 (IUD-P) mit einer verlängerten lutealen Phase (Progesterondominanz) einen geringeren Nachweis an ER- und PR-Rezeptoren, dagegen die Tiere der Gruppe 4 (IUD-N) mit regulärer lutealer Phase (Östrogendominanz) eine stärkere Expression. Die Steroidhormonexpression spiegelt folglich die vorliegende Hormonkonzentration (Progesteron/Östrogen) im Blut wider und lässt nur wenige Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der IUDs zu. In Folgearbeiten sollte die Oxytocinkonzentration im Blut, die endometrialen Oxytocinrezeptoren sowie das Hormon LH inklusiv der Rezeptoren geprüft werden.

Weiterhin ist eine Aktivierung der COX2 durch eine *entzündliche Reaktion* denkbar. Im eigenen Untersuchungsgut konnte jedoch keine chronische Endometritis oder eine statistisch signifikante Infiltration mit Entzündungszellen im Endometrium bei den IUD-Stuten nachgewiesen werden. Uteroferrin (UF) kann reaktive Sauerstoff-Spezies generieren, hat eine saure Phosphatase-Aktivität (ODDIE et al. 2000, HALLEEN et al. 2003, RAISANEN et al. 2005) und besitzt somit wichtige Aufgabe in der Immunabwehr. In der Humanmedizin wird UF als Biomarker für chronische Entzündungen verwendet (JANCKILA und YAM 2009, JANCKILA et al. 2011). Zudem bezeichnet JOSHI (1969) die Erhöhung der sauren Phosphatase-Aktivität in der uterinen Flüssigkeit als biochemischen Beweis für eine Entzündung, die durch IUDs bei der Ratte ausgelöst wird. Eine Aufregulierung des Proteins kann somit hinweisend auf eine Entzündung sein. Zyklusunabhängig (Lutealphase) zeigen die IUD-Stuten des eigenen Untersuchungsguts einen höheren UF-Sekretionsscore als die KB-Stuten, dabei ist der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 3 statistisch signifikant. Daher ist es wahrscheinlich, dass UF als Sekret der endometrialen Drüsen möglicherweise an einer intraluminalen Entzündung, verursacht durch die IUDs in der Gruppe 3, beteiligt ist.

Bei der Frau treten nach dem Einsatz von IUDs massenhaft Makrophagen im Uteruslumen ohne zelluläre Infiltration des Endometriums auf (SAGIROGLU und SAGIROGLU 1970), dieser Befund wird als eine Fremdkörperreaktion auf die IUDs interpretiert. MEYER (2003) und HOLM und JESPERSEN (2003) weisen um die IUDs eine entzündliche Masse nach, ohne Veränderungen in den Endometriumbiopsaten festzustellen. Diese luminale Entzündung könnte Ursache für eine COX2 Induktion mit nachfolgender $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung sein und im weiteren Verlauf die Zykluslänge modifizieren. In weiteren Studien ist eine Untersuchung der intraluminalen Flüssigkeit hinsichtlich inflammatorische Faktoren anzustreben.

Zusammenfassend wird das Enzym COX2 möglicherweise durch mechanische, entzündliche oder hormonelle Stimuli der IUDs induziert, so dass die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion steigt.

Uterokalin (UK) zeigt ein deutlich variables Expressionsmuster innerhalb aller Versuchsgruppen, sodass sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der UK-Expression zwischen den Gruppen ergeben. Eine Interpretation des Expressionsverhaltens ist aufgrund der starken Schwankungen bei den eigenen Versuchstieren abschließend nicht sicher möglich.

Dagegen zeigen die Stutengruppen (IUD-P und IUD-N) Unterschiede in der Uteroglobulin (UG)-Expression. UG besitzt eine anti-inflammatorische Wirkung und schützt den Organismus vor einer übermäßigen Aktivierung entzündlicher Prozesse infolge äußerer Umwelteinflüsse (AUMÜLLER et al. 1985, DIERYNCK et al. 1995, COTE et al. 2012). IUD-P-Tiere besitzen eine geringere UG-Expression als die IUD-N-Stuten, dieser Befund ist möglicherweise hinweisend auf Störungen in der Beendigungsphase der Entzündung durch die verminderte anti-inflammatorische Wirkung, so dass eine persistierende intraluminale Entzündung im Uterus entstehen kann. Jedoch fehlen Angaben in der Literatur zu späten Stadien sowie zu der Beendigungsphase der Endometritis. Dazu passend besitzen diese Tiere (IUD-P, Median: 169 Zellen) eine dezent höhere T-Lymphozytendichte, die einer persistierenden anstatt einer abklingenden Entzündung (IUD-N, Median: 119 Zellen) entsprechen könnte, da die Anzahl von Lymphozyten bei dem Vorliegen von chronischen Entzündungen im Endometrium steigt (WATSON und STOKES 1988, WATSON und THOMSON 1996). Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant.

Zudem besitzen die IUD-P-Tiere in der eigenen Studie eine erhöhte Anzahl von Makrophagen im Vergleich zu den IUD-N-Stuten. Das Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, zuständig für die immunologische Homöostase, ist bei Endometritis-resistenten und -empfindlichen Stuten unterschiedlich. Dabei weisen empfindlichen Stuten höhere Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine auf (FUMUSO et al. 2003). Die Autoren vermuten, dass Makrophagen möglicherweise verantwortlich sind für diese erhöhte Zytokin-Produktion, ein ähnlicher Zusammenhang ist bei den IUD-P und IUD-N Stuten denkbar. Zusammenfassend könnten diese Befunde auf eine unterschiedliche entzündliche Reaktion des Endometriums auf die IUDs hinweisen, vergleichbar den Ergebnissen der COX2-Expression. Diese ist unter Umständen mitverantwortlich für die unterschiedliche Ef-

fektivität der IUDs. Bei zwei IUD-Stuten wurde eine akut eitrige Endometritis aufgrund der Beteiligung von neutrophilen Granulozyten diagnostiziert. Das erhöhte Vorkommen von neutrophilen Granulozyten bei einzelnen IUD-Tieren könnte als hinweisend auf das Vorliegen einer Endometritis-Empfindlichkeit („susceptible mares“) zu interpretieren sein. Allerdings ist eine abschließende Aussage diesbezüglich erst nach einer Studie an einem umfangreicheren Tiergut möglich.

Die IUD-N-Stuten besitzen demnach eine funktionierende Abwehr und bekämpfen die Entzündung erfolgreich, so dass es bei der vermehrten $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung zu einer vorzeitigen, wie teils von NIE et al. (2003) beobachtet, oder zu einer regulären Regression des Corpus luteum kommt. Bei den IUD-P-Tieren fällt die Reaktion schwächer aus, die Entzündung im Uteruslumen kann nicht eliminiert werden und bleibt geringgradig temporär bestehen. RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) stellen bei den IUD-Stuten mit verlängerter lutealer Phase eine verminderte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung und Uteruskontraktilität fest. Dies stimmt mit den eigenen Beobachtungen überein. $\text{PGF}_{2\alpha}$ löst lediglich mit pulsatilen Peaks eine Luteolyse aus, eine konstante geringe Freisetzung vermag dies nicht.

Ein weiterer Einflussfaktor ist möglicherweise der Zeitpunkt des Einsetzens der IUDs in den Uterus. Das Corpus luteum reagiert erst nach seiner Ausreifung auf $\text{PGF}_{2\alpha}$ (vgl. Abb. 5.1, S. 92), zuvor wird keine Luteolyse ausgelöst (ALLEN und ROWSON 1973), oder es erfolgt, je nach Reife des Corpus luteum, eine partielle Luteolyse mit einem Abfall der Progesteronwerte und anschließendem Rebound der Progesteronkonzentration (TROEDSSON et al. 2001). Ein solches Progesteronprofil beobachten RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) bei den IUD-P-Stuten ihrer Studie.

Untersuchungen von CUERVO-ARANGO und NEWCOMBE (2012) zufolge löst Cloprostenol ($\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon), wenn auch nicht signifikant, in niedrigen Dosen und bei nicht-ausgereiften Gelbkörpern eine Verlängerung des interovulatorischen Intervalls aus. Weiter ist bei Schafen, je nach Zeitpunkt des uterinen Einsatzes der IUDs, der Zyklus verkürzt, verlängert oder bleibt unverändert (NALBANDOV et al. 1955). NIE et al. (2003) beobachtet, dass IUDs, die vor der Ovulation eingesetzt werden, häufiger wieder ausgeworfen werden. ARGO und TURNBULL (2010) setzen die IUDs am Tag der Ovulation ein und erreichen damit keine Verlängerung der lutealen Phase. Der Einsatztag der IUDs bei RIVERA DEL ALAMO et al. (2008) entspricht dem 2. bis 4. Tag p.ov. und stellt somit, im Vergleich zu den anderen Studien, den spätesten Zeitpunkt zum Einsetzen der IUDs nach der Ovulation dar. Diese Studie erreicht mit 9/12 (76 %) IUD-Stuten mit vLP die höchste Erfolgsrate bei der Rosseunterdrückung mittels IUDs. In der vorliegenden Arbeit wurde der intrauterine Ball an Tag 3 nach der Ovulation eingesetzt und die Verlängerung der lutealen Phase wurde bei 7/15 (47 %) IUD-Stuten erreicht. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Ausreifung des Gelbkörpers und somit der Zeitpunkt des Einsetzens der IUDs eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Wirkung der IUDs spielt. Zudem spielt ebenfalls die Dosis von $\text{PGF}_{2\alpha}$ (CUERVO-ARANGO und NEWCOMBE 2012) eine Rolle und somit die Intensität der Induktion von COX2, da eine enge Korrelation zwischen der COX2-Expression und der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -

Produktion besteht (BOERBOOM et al. 2004). Dies würde die These bekräftigen, dass die Stuten mit einer unterschiedlich starken luminalen Entzündung auf die IUDs reagieren und folglich die COX2-Aktivierung/PGF_{2α}-Produktion verschieden ausfällt.

Insgesamt lassen die eigenen Untersuchungen die Schlussfolgerung zu, dass die IUDs das Enzym COX2 induzieren und nachfolgend so die PGF_{2α}-Freisetzung erhöhen. Die Induktion erfolgt möglicherweise hormonell, mechanisch oder durch entzündliche Stimuli, der entscheidende Faktor kann im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Der Einfluss der Prostaglandine auf den bestehenden Gelbkörper ist abhängig von dessen Reifegrad und variiert folglich, je nach Zeitpunkt des Einsetzens der IUDs (vgl. Abb. 5.1). Die unterschiedliche Effektivität wird möglicherweise desweiteren durch das Alter und die endometrialen Gefäßalterationen beeinflusst, sowie, ähnlich wie bei den resistenten und empfänglichen Stuten, durch eine unterschiedliche Endometritisanfälligkeit der einzelnen Tiere. Abschließend ist der Wirkmechanismus der IUDs jedoch weiterhin unklar. Die eigenen Untersuchungsergebnisse verdeutlichen jedoch, dass insbesondere die Hypothese eines alleinigen Placeboeffektes oder aber eine Scheinträchtigkeit nahezu ausgeschlossen werden können. Zukünftige Ansatzpunkte sollten daher insbesondere Untersuchungen zu Entzündungsmediatoren beinhalten, z. B. Zytokinen.

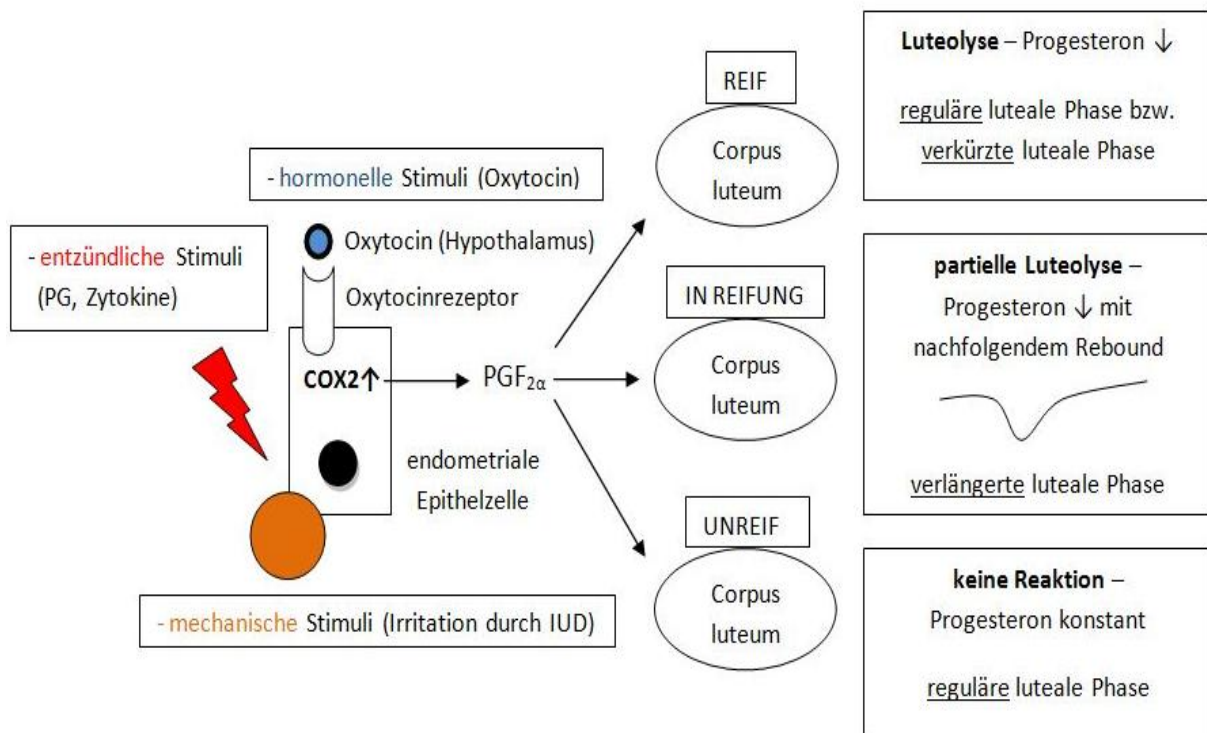


Abb. 5.1: Möglicher Wirkmechanismus der IUDs bei Equiden

Legende zu Abb 5.1: ↓ abnehmender Wert, PG: Prostaglandin, IUD: intrauterine device, Kurve: Progesteronkonzentration nach partieller Luteolyse, COX2: Cyclooxygenase2

6 ZUSAMMENFASSUNG

Veronika Klein, geb. Waltl

Auswirkung intrauteriner Plastikbälle („small uterine devices“) auf die histomorphologischen und immunhistologischen Befunde des equinen Endometriums

Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im September 2014

96 S., 54 Abb., 43 Tab., 368 Lit., 7 S. Anhang

Schlüsselworte: intrauterine Plastikbälle, Rosseunterdrückung, Pferd, Endometrium, Immunhistologie

Intrauterine Bälle („small uterine device“; IUDs) sind aus Glas, Plastik oder Metall und werden vaginal in den Uterus eingeführt. Bei Stuten werden IUDs im Turniersport zur Unterdrückung der unerwünschten Verhaltensänderungen während der Rosse eingesetzt. Der Einsatz ist einfach, günstig und minimal invasiv. Der Effekt wird durch eine Verlängerung der primären lutealen Phase erzielt, wobei jedoch der exakte Ablauf des Wirkmechanismus bisher ungeklärt ist. Hypothesen wie eine Scheinträchtigkeit, ein Placeboeffekt bei den Besitzern und eine chronische Endometritis werden in der Literatur diskutiert.

Für die Untersuchung wurden 30 Stuten in vier Gruppen (G) eingeteilt: G1: KB (künstlich besamt) und tragend (n=8); G2: KB, nicht-tragend (zyklisch; n=7); G3: IUD, verlängerte luteale Phase (n=7) IUD-P (IUD-Positiv); G4: IUD, reguläre luteale Phase (n=8) IUD-N (IUD-Negativ). Die Uterusbiospien wurden am Tag 15 post ovulationem entnommen.

Das Ziel der Studie war, mittels immunhistologischer Untersuchungen die Expression des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX2), verschiedener uteriner Proteine (Uteroglobin, Uteroferrin, Uterokalin), Hormonrezeptoren (Östrogen-, Progesteronrezeptor) und des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen in endometrialen Biopsien bei IUD-Stuten darzustellen sowie die erhobenen Befunde mit den Ergebnissen am equinen Endometrium künstlich besamter Stuten zu vergleichen. Weiter wurde in den Endometriumbiopsaten das Auftreten von Entzündungszellen analysiert (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen). Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (SPSS Software-GmbH München).

Hinsichtlich der Altersverteilung sind die Stuten der Gruppe 1 (KB/tragend) jünger als Tiere der Gruppe 2 (KB/nicht-tragend). Ein entsprechendes Ergebnis kann für die Stuten der Gruppe 3 (IUD-P) im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 4 (IUD-N) erhoben werden. Darüber hinaus sind Angiopathien bei den Pferden der Gruppe 1 bzw. 3 geringer ausgeprägt als bei den Stuten der Gruppe 2 bzw. 4.

Immunhistologisch sind die endometrialen Drüsenzellen der Tiere aus Gruppe 1 durch eine maximale Uterokalin-(UK)-Expression gekennzeichnet, wohingegen Uteroferrin (UF) ledig-

lich schwach exprimiert wird. Eine COX2-Expression kann bei diesen Stuten nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu den graviden Pferden (Gruppe 1) zeigen künstlich besamte, nicht-tragende Stuten (Gruppe 2) zwar eine ausgeprägte UF- und COX2-Expression, UK wird dagegen lediglich gering exprimiert. Die KB-tragenden (Gruppe 1) und nicht-tragenden (Gruppe 2) Tiere sind somit durch eine ihrem Reproduktionszyklus entsprechende Expression der genannten Marker gekennzeichnet. Die IUD-Stuten (Gruppe 3 und 4) dagegen zeigen eine variable COX2, UF- und UK-Expression. Keine statistisch signifikanten Unterschiede sind zwischen allen Gruppen in der UG- und der Ki-67 Antigen-Expression nachweisbar. Stuten mit einer verlängerten lutealen Phase (Gruppe 1 und 3) und hohen Progesteronwerten im Serum besitzen eine geringere ER- und PR-Expression als die Versuchstiere mit einer regulären lutealen Phase (Gruppe 2 und 4) und einer Östrogendominanz.

Die Auszählung der Entzündungszellen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Plasmazellen sowie Lymphozyten zwischen den Gruppen. Im Stratum compactum ist die Zahl der Makrophagen in Gruppe 1 (tragend) signifikant höher als in Gruppe 2 (zyklisch), ebenfalls zeigt sich ein Anstieg dieser Zellen von der Gruppe 4 zu 3, allerdings ist diese Erhöhung nicht statistisch signifikant.

Ein *Placeboeffekt* bei den Besitzern kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Expression der Proteine (UF, UK) und COX2 in den IUD-Stuten, im Vergleich zu den KB-Stuten, signifikante Unterschiede aufweist. Da im eigenen Untersuchungsgut zwischen den tragenden Stuten (Gruppe 1) und den IUD-Stuten der Gruppe 3 (vLP)/„Scheinträchtigkeit“ ein signifikant unterschiedliches Expressionsverhalten hinsichtlich des Enzyms COX2 und des Proteins UF besteht, kann die Hypothese einer *Scheinträchtigkeit* ebenso als unwahrscheinlich eingestuft werden. Bei keiner der IUD-Stuten konnte eine *chronische Endometritis* nachgewiesen werden, somit ist auch diese Hypothese als Ursache des IUD-Effektes eher unwahrscheinlich. Die erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Gruppe 3 könnte jedoch hinweisend auf einen lokalen Effekt der IUDs im Sinne einer Fremdkörperreaktion sein. Da hinsichtlich des Auftretens einer Endometritis zwischen resistenten und empfänglichen Tieren unterschieden wird, könnte somit die erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Gruppe 3 möglicherweise als Hinweis auf „Endometritis empfängliche Stuten“ gewertet werden und dies eine Ursache für die variierende Wirksamkeit der Rosseunterdrückung mittels IUDs darstellen. Die eigenen Untersuchungen zeigen ferner, dass die IUD-Stuten mit verlängerter lutealer Phase (IUD-positive Wirkung, Gruppe 3) jünger sind im Vergleich zu den Tieren, die trotz IUD eine Luteolyse (IUD-negative Wirkung, Gruppe 4) aufweisen. Zudem weisen die IUD-P Tiere geringere Angiopathien auf. Möglicherweise sind zudem das Alter und die Perfusion des Uterus bedeutend für die Wirksamkeit der IUDs in Equiden.

Abschließend kann somit der Wirkmechanismus der IUDs auch mittels der durchgeführten Untersuchungen nicht endgültig geklärt werden. Unter Berücksichtigung der erhobenen Befunde sollten zukünftige Studien insbesondere Untersuchungen zu Entzündungsmediatoren, wie z.B. Zytokine, beinhalten.

7 SUMMARY

Veronika Klein, geb. Waltl

Effects of small uterine devices (IUD) on histomorphological and immunohistochemical findings in the equine endometrium

Institute of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2014

96 pages, 54 figures, 43 tables, 368 references, 7 pages appendix

Keywords: intrauterine devices, oestrus suppression, equine, endometrium, immunohistochemistry

Intrauterine devices (IUDs) are of glass, plastic or metal and are inserted through the vagina into the uterus. In sports mares intrauterine devices are utilized to suppress unwanted signs of oestrus behaviour during competition. The use is easy, inexpensive and minimal invasive. The oestrus suppression in mares by IUDs is caused by prolonging primary luteal function. However, the exact biological mechanism is still unknown. Hypotheses such as pseudopregnancy, placebo effect for mare owners and chronic endometritis are discussed.

For the study 30 mares were subdivided into four groups (G): G1: AI (artificial insemination), pregnant (n=8); G2: AI, non-pregnant (cycling; n=7); G3: IUD, prolonged luteal phase (n=7) IUD-P (IUD-Positive); G4: IUD, luteal phase of regular length (n=8) IUD-N (IUD-Negative). Biopsies were taken on day 15 post-ovulation. The aim of this immunohistochemical study was to investigate the expression patterns of different uterine proteins (uteroglobin, uteroferrin, uterocalin), the enzyme cyclooxygenase 2 (COX2), hormone receptors (oestrogen-, progesteronereceptor) and Ki-67 antigen in endometrial biopsies of mares with IUDs, compared to the expression in mares after artificial insemination (AI). Furthermore the endometrial biopsy samples were analyzed for the number of inflammatory cells (neutrophils, eosinophils, mast cells, lymphocytes, plasma cells and macrophages). For analysis of the results the statistical package SPSS (SPSS Software-GmbH Munich) was used.

Regarding age distribution the mares of G1 (AI, pregnant) are younger in comparison to animals of group 2 (AI, non-pregnant). This can also be found for horses of group 3 (IUD-P) compared to animals of group 4 (IUD-N). In addition group 1 and 3 showed less angiopathies as group 2 and 4 respectively.

By immunohistochemical investigation, endometrial glandular cells of horses of group 1 are characterised by a maximal uterocalin (UC) expression, while just a weak expression of uteroferrin (UF) is detected. No COX2-expression is detectable in group 1. Compared to these findings, non-pregnant animals (group 2) are characterised by a distinctive UF- and COX2-expression, while the glandular cells show just a mild expression of UC. In summary, in ani-

mals of group 1 and 2 an expression according to the stage of cycle is detectable. In contrast, IUD-mares (group 3 and 4) show a variable expression of COX2, UF and UC.

No significant differences of UG-expression and the expression of the proliferation marker Ki-67 antigen can be determined between all groups. Mares with prolonged luteal phase (group 1: AI, pregnant; group 3: IUD-P) and high serumprogesterone concentration show a lower ER- and PR-expression in comparison to mares with regular luteal phase (group 2: AI, cycling; group 4: IUD-N) and oestrogen dominance. No significant differences occur between the numbers of neutrophils, eosinophils, mast cells, plasma cells and lymphocytes in the endometrial samples of the groups. In the stratum compactum total numbers of macrophages in group 1 (pregnant) are significantly higher than in group 2 (cycling), there is also a increase in numbers of macrophages among group 4 to 3, but the difference is not statistically significant.

The endometrial changes of the immunolabelling for proteins and COX-2 in the IUD-mares compared to AI-mares confirm that the effect of IUDs on the behaviour of the mare cannot be explained by a *placebo effect*. As pregnant mares and IUD-mares with prolonged luteal phase showed significantly different expression patterns for COX-2 and UF it can be supposed, that *pseudopregnancy* in IUD-mares with prolonged luteal phase is unlikely. In none of the IUD-mares a *chronic endometritis* could be determined. The higher number of macrophages in group 3 (IUD-P) could be indicative for a local effect (foreign body reaction) of IUDs in horses. As uterine susceptibility to endometritis varies between mares (resistant/susceptible), the increased number of macrophages in the animals of group 3 could be assessed as indicative for susceptible mares. Maybe this is one reason for the differing efficiency of IUDs in the mares. Possibly the age of the mare and the degree of angiosclerosis are relevant for efficiency as well, as IUD-P-mares are younger and have less vascular alterations than IUD-N-animals. In summary the mechanism of luteolysis inhibition by IUDs can finally not be explained by this study. Regarding the previous findings, further investigations should include an examination of inflammatory mediators such as cytokines.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ababneh M, Ababneh H, Shidaifat F. Expression of cytosolic phospholipase A2 in equine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2011;46:268-74.
- Abd-Elnaeim MM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta.* 2006;27:1103-13.
- Abdelgawad AH, Topozada HK, Elsayi M, Saleh F, Elsayhi S. Study of Uterine Environment in Association with Intrauterine Contraceptive Devices. *Contraception.* 1977;16:469-85.
- Adams GP, Bosu WTK. Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare - An Overview and Update. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4:161-76.
- Alexander SL, Irvine CHG. FSH and LH. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction.* 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2011a. p. 1619-30.
- Alexander SL, Irvine CHG. GnRH. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction.* 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2011b. p. 1608-18.
- Allen WR. Proceedings of the Hughes JP. International Workshop on Equine Endometritis - Summary. *Equine Vet J.* 1993;25:185-93.
- Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction.* 2001;121:513-27.
- Allen WR, Hamilton DW, Moor RM. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat Rec.* 1973;177:485-501.
- Allen WR, Moor RM. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil.* 1972;29:313-6.
- Allen WR, Rowson LE. Control of the mare's oestrous cycle by prostaglandins. *J Reprod Fertil.* 1973;33:539-43.
- Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares: a preliminary study. *Equine Vet J.* 2006;38:454-9.
- Alvarez F, Schilardi PL, de Mele MF. Reduction of the "burst release" of copper ions from copper-based intrauterine devices by organic inhibitors. *Contraception.* 2012;85:91-8.
- Amoroso EC. Placentation. In: Parkes AS, Hrsg. *Marshall's physiology of Reproduction.* London: Longmans; 1952. p. 127-311.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20:86-100.
- Arbeiter K, Gager G, Kopschitz MM, Lorin D. Die Uterusbiopsie in der Sterilitätsdiagnostik der Stuten. *Zuchthyg.* 1976;11:175-83.

- Aresu L, Benali S, Giannuzzi D, Mantovani R, Castagnaro M, Falomo ME. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *J Vet Sci.* 2012;13:171-7.
- Argo CM, Turnbull EB. The effect of intra-uterine devices on the reproductive physiology and behaviour of pony mares. *Vet J.* 2010;186:39-46.
- Arthur GH. An analysis of the reproductive function of mares based on post-mortem examination. *Vet Rec.* 1958;70:682-6.
- Asa CS, Goldfoot DA, Garcia MC, Ginther OJ. Sexual-Behavior in Ovariectomized and Seasonally Anovulatory Pony Mares (*Equus-Caballus*). *Horm Behav.* 1980;14:46-54.
- Asa CS, Goldfoot DA, Ginther OJ. Sociosexual Behavior and the Ovulatory Cycle of Ponies (*Equus-Caballus*) Observed in Harem Groups. *Horm Behav.* 1979;13:49-65.
- Asbury AC, Schultz KT, Klesius PH, Foster GW, Washburn SM. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J Reprod Fertil Suppl.* 1982;32:151-9.
- Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S et al. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2010;122:124-32.
- Aumüller G, Seitz J, Heyns W, Kirchner C. Ultrastructural localization of uteroglobin immunoreactivity in rabbit lung and endometrium, and rat ventral prostate. *Histochemistry.* 1985;83:413-7.
- Aupperle H. Immunhistologische Untersuchungen am Endometrium der Stute [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1997.
- Aupperle H, Özgen S, Schoon HA, Schoon D, Hoppen HO, Sieme H et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet J.* 2000;32:228-32.
- Aupperle H, Schoon D, Schoon HA. Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. *Res Vet Sci.* 2004;76:249-55.
- Aupperle H, Steiger K, Reischauer A, Schoon HA. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. *Pferdeheilkunde.* 2003;19:629-32.
- Aurich C. Reptroduktionsmedizin beim Pferd. 2. Aufl. Stuttgart: Parey; 2009.
- Aurich C. Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:220-8.
- Bae SE, Watson ED. A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. *Theriogenology.* 2003;60:909-21.
- Banu SK, Lee J, Satterfield MC, Spencer TE, Bazer FW, Arosh JA. Molecular cloning and characterization of prostaglandin (PG) transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathways in transport of PGF2alpha. *Endocrinology.* 2008;149:219-31.

- Basha SM, Bazer FW, Geisert RD, Roberts RM. Progesterone-induced uterine secretions in pigs. Recovery from pseudopregnant and unilaterally pregnant gilts. *J Anim Sci*. 1980;50:113-23.
- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. Success rates when attempting to non-surgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet J Suppl*. 1997;60-2.
- Baumbach GA, Ketcham CM, Richardson DE, Bazer FW, Roberts RM. Isolation and characterization of a high molecular weight stable pink form of uteroferrin from uterine secretions and allantoic fluid of pigs. *J Biol Chem*. 1986;261:12869-78.
- Baumbach GA, Saunders PT, Bazer FW, Roberts RM. Uteroferrin has N-asparagine-linked high-mannose-type oligosaccharides that contain mannose 6-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;29:85-9.
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*. 2009;138:195-209.
- Bazer FW, Thatcher WW. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins*. 1977;14:397-400.
- Bazer FW, Worthington-White D, Fliss MF, Gross S. Uteroferrin: a progesterone-induced hematopoietic growth factor of uterine origin. *Exp Hematol*. 1991;19:910-5.
- Behrens C, Aurich JE, Klug E, Naumann H, Hoppen HO. Inhibition of gonadotrophin release in mares during the luteal phase of the oestrous cycle by endogenous opioids. *J Reprod Fertil*. 1993;98:509-14.
- Beier HM. Uteroglobin: A hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta*. 1968;160:289-91.
- Beier HM. Oviductal and uterine fluids. *J Reprod Fertil*. 1974;37:221-37.
- Beier-Hellwig K, Kremer H, Bonn B, Linder D, Bader H, Beier HM. Partial sequencing and identification of three proteins from the equine uterine secretion regulated by progesterone. *Reprod Domest Anim*. 1995;30:295-8.
- Bennett DG, Poland JH, Kaneps AJ, Snyder SP. Histologic effect of infusion solutions on the equine endometrium. *Equine Practice*. 1981;3:37-44.
- Bergfelt DR, Ginther OJ. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology*. 1985;24:99-108.
- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat*. 1982;135:191-209.
- Betteridge KJ, Mitchell D. Direct Evidence of Retention of Unfertilized Ova in Oviduct of Mare. *J Reprod Fertil*. 1974;39:145-8.

- Beuke C. Einfluß unterschiedlicher Verdünner im Vergleich zur Besamung mit nativem Sperma auf die morphofunktionelle Reaktion des Endometriums der Empfängerstuten [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2001.
- Bezard J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. Chronology of equine fertilisation and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Vet J*. 1989;21:105-10.
- Bhalla RC, Casida LE. Effect of intrauterine devices on pituitary gonadotropins, ovulation and pseudopregnancy in rabbits. *Biol Reprod*. 1970;2:58-62.
- Blüthgen U. Untersuchungen zu Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von eosinophilen Granulozyten im Endometrium der Stute unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens von Sproßpilzen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.
- Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K et al. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod*. 2004;70:391-9.
- Boeta M, Zarco L. Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. *Anim Reprod Sci*. 2012;130:57-62.
- Bracher V, Gerstenberg C, Allen WR. Der Einfluss von Endometrose (degenerativer Endometriumserkrankung) auf Fruchtbarkeit, Plazentation und fötale Entwicklung beim Pferd. *Pferdeheilkunde*. 1997;13:465-73.
- Brandt GW. The significance and interpretation of uterine biopsy in the mare. *Proc Annu Meet Am Assoc Equine Pract*. 1970;16:279-94.
- Braselton WE, Jr., McShan WH. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Arch Biochem Biophys*. 1970;139:45-58.
- Briant C, Ottogalli M, Morel M, Guillaume D. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. *Domest Anim Endocrinol*. 2003;24:305-22.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990;489-503.
- Brunckhorst D, Schoon D. Stellenwert der histologischen Untersuchung von Uterusbiopsien bei der Diagnose von Fertilitätsstörungen der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Hrsg. 11. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.; 1990 März 8; Gießen: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; 1990. S. 181-9.
- Brunckhorst D, Schoon HA, Bader H, Sieme H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität*. 1991;7:44-51.
- Bruno S, Darzynkiewicz. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992;25:31-40.

- Bune AJ, Hayman AR, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disordered macrophage inflammatory responses and reduced clearance of the pathogen, *Staphylococcus aureus*. *Immunology*. 2001;102:103-13.
- Causey RC. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *Vet J*. 2006;172:405-21.
- Chilton BS, Daniel JC, Jr. Differences in the rabbit uterine response to progesterone as influenced by growth hormone or prolactin. *J Reprod Fertil*. 1987;79:581-7.
- Combs GB, LeBlanc MM, Neuwirth L, Tran TQ. Effects of Prostaglandin F_{2α}, Cloprostenol and Fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology*. 1995;45:1449-55.
- Corfman PA, Segal SJ. Biologic effects of intrauterine devices. *Am J Obstet Gynecol*. 1968;100:448-459.
- Cote O, Lillie BN, Hayes MA, Clark ME, van den BL, Katavolos P et al. Multiple secretoglobin 1A1 genes are differentially expressed in horses. *BMC Genomics*. 2012;13:712.
- Crossett B, Allen WR, Stewart F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem J*. 1996;320:137-43.
- Crossett B, Suire S, Herrler A, Allen WR, Stewart F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol Reprod*. 1998;59:483-90.
- Crowell-Davis SL. Sexual behavior of mares. *Horm Behav*. 2007;52:12-7.
- Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Relationship between dose of cloprostenol and age of corpus luteum on the luteolytic response of early dioestrous mares: a field study. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(4):660-5.
- Daels PF, Hughes JP. Fertility control using intrauterine devices: an alternative for population control in wild horses. *Theriogenology*. 1995;44:629-39.
- Daels PF, McCue PM, DeMoraes MJ, Hughes JP. Persistence of the luteal phase following ovulation during altrenogest treatment in mares. *Theriogenology*. 1996;46:799-811.
- Dees WL, Sorensen AM, Jr., Kemp WM, McArthur NH. GnRH localization in the equine brain and infundibulum: an immunohistochemical study. *Brain Res*. 1981;208:123-34.
- Dierynck I, Bernard A, Roels H, DeLey M. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein CC16. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;1:205-10.
- Dietz O, Huskamp B, Hrsg. *Handbuch Pferdepraxis*. 3. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2005
- Döcke F. Keimdrüse. In: Döcke F, Hrsg. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena, Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. S. 399-508.
- Doyle LL, Margolis AJ. Intrauterine Foreign Body - Effect on Pregnancy in Rat. *Science*. 1963;139:833-4.

Doyle LL, Margolis AJ. Intrauterine Foreign Body .I. Effect on Reproductive Processes in Rat. *Fertil Steril*. 1964;15:597-606.

Ducsay CA, Buhi WC, Bazer FW, Roberts RM. Role of uteroferrin in placental iron transport in swine: relationship between uteroferrin levels and iron deposition in the conceptus during gestation. *J Anim Sci*. 1986;62:706-16.

Ealy AD, Eroh ML, Sharp DC, III. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim Reprod Sci*. 2010;117:99-105.

Eckstein P. Mechanisms of Action of Intra-Uterine Contraceptive Devices in Women and Other Mammals. *Br Med Bull*. 1970;26:52-9.

El Etreby MF, Beier HM, Elger W, Mahrous AT, Topert M. Immunocytochemical localization of uteroglobin in the genital tract of male rabbits. *Cell Tissue Res*. 1983;229:61-73.

El Sahwi S, Moyer DL. Antifertility effects of the intrauterine foreign body. *Contraception*. 1970;2:1-28.

Ellenberger C. Funktionelle Pathologie des equinen Ovars und daraus resultierende endometriale Differenzierungsstörungen [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Ellenberger C, Bartmann CP, Hoppen HO, Kratzsch J, Aupperle H, Klug E et al. Histomorphological and immunohistochemical characterization of equine granulosa cell tumours. *J Comp Pathol*. 2007;136:167-76.

Ellenberger C, Bartmann CP, Klug E, Hoppen H-O, Hoffmann C, Bazer FW et al. Immunohistochemical characterisation of equine endometrial maldifferentiation with special emphasis on uterine secretory proteins. In: Alvarenga M, Wade JF, Hrsg. 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer; 2004 Aug 4; Rio de Janeiro, Brazil. Newmarket, Suffolk: Have-meyer Foundation; 2004. p. 13-5.

Ellenberger C, Wilsher S, Allen WR, Hoffmann C, Kolling M, Bazer FW et al. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology*. 2008;70:746-57.

Elstein M, Ferrer K. The effect of a copper-releasing intrauterine device on sperm penetration in human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*. 1973;32:109-11.

Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: Fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*. 2000;257:231-7.

Evans MJ, Alexander SL, Irvine CH, Kitson NE, Taylor TB. Administration of a gonadotropin-releasing hormone antagonist to mares at different times during the luteal phase of the estrous cycle. *Anim Reprod Sci*. 2011;127:188-96.

Evans MJ, Hamer JM, Gason LM, Graham CS, Asbury AC, Irvine CHG. Clearance of Bacteria and Non-Antigenic Markers Following Intrauterine Inoculation Into Maiden Mares - Effect of Steroid-Hormone Environment. *Theriogenology*. 1986;26:37-50.

- Evans MJ, Hamer JM, Gason LM, Irvine CH. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 1987;35:327-34.
- Evans MJ, Irvine CH. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;193-200.
- Facchiano A, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB. Inhibition of pancreatic phospholipase A2 activity by uteroglobin and antiinflammin peptides: possible mechanism of action. *Life Sci.* 1991;48:453-64.
- Fahmy K, el-Gazar A, Eisa I, Ghonaim M, Saad S, Afifi A. Levels of serum steroid hormones in intrauterine contraceptive device users. *Gynecol Endocrinol.* 1991;5:1-5.
- Farrow J, Melby J, Wiese L, Lohnas J, Welch R, Pilon AL. Binding of rhCC10 to fibronectin and its effect on cellular adhesion. *Uteroglobin/Clara Cell Protein Family.* 2000;923:338-42.
- Ferreira-Dias GM, Nequin LG, King SS. Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II, and III, using light and transmission electron microscopy. *Am J Vet Res.* 1999;60:49-55.
- Fliss AE, Michel FJ, Chen CL, Hofig A, Bazer FW, Chou JY et al. Regulation of the uteroferrin gene promoter in endometrial cells: interactions among estrogen, progesterone, and prolactin. *Endocrinology.* 1991;129:697-704.
- Flood PF, Jong A, Betteridge KJ. Location of Eggs Retained in the Oviducts of Mares. *J Reprod Fertil.* 1979;57:291-4.
- Fordyce G, Jubb TF, Fitzpatrick LA, Whyte TR, Cooper NJ, Bolam MJ et al. Contraceptive efficacy of an intra-uterine device in Brahman cattle. *Anim Reprod Sci.* 2001;65:193-204.
- Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. Time of Embryo Transport Through the Mare Oviduct. *Theriogenology.* 1991;36:823-30.
- Fretz PB. Behavioral Virilization in A Brood Mare. *Appl Anim Ethology.* 1977;3:277-80.
- Fumuso E, Giguere S, Wade J, Rogan D, Videla-Dorna I, Bowden RA. Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;96:31-41.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-5.
- Garza F, Thompson DL, French DD, Wiest JJ, Stgeorge RL, Ashley KB et al. Active Immunization of Intact Mares Against Gonadotropin-Releasing-Hormone - Differential-Effects on Secretion of Luteinizing-Hormone and Follicle-Stimulating-Hormone. *Biol Reprod.* 1986;35:347-52.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31:13-20.

- Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod Fertil.* 1999;116:167-75.
- Gilbert RO. Cyclical changes in equine endometrial histology. 12th International Conference on Animal Reproduction, Den Haag; 1992. p. 1867-9.
- Ginther OJ. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J Anim Sci.* 1974;39:550-64.
- Ginther OJ. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology.* 1983;19:603-11.
- Ginther OJ. Reproductive Biology of the mare. 2 Aufl. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices; 1992.
- Ginther OJ, Hannan MA, Beg MA. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂alpha, progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domest Anim Endocrinol.* 2011;41:174-84.
- Ginther OJ, Whitmore HL, Squires EL. Characteristics of estrus, diestrus, and ovulation in mares and effects of season and nursing. *Am J Vet Res.* 1972;33:1935-9.
- Ginther OJ, Woody CO, Janakira K, Casida LE. Effect of An Intra-Uterine Plastic Coil on Oestrous Cycle of Heifer. *J Reprod Fertil.* 1966;12:193-8.
- Goddard PJ, Allen WE. Genital tract pressures in mares II. Changes induced by oxytocin and prostaglandin F(2)alpha. *Theriogenology.* 1985;24:35-44.
- Godkin JD, Bazer FW, Moffatt J, Sessions F, Roberts RM. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J Reprod Fertil.* 1982;65:141-50.
- Goff AK, Basu S, Kindahl H. Measurement of 11-Ketotetranor Pgf Metabolites - An Approach for Monitoring Prostaglandin-F2-Alpha Release in the Mare. *Theriogenology.* 1984;21:887-96.
- Gonzalez BY, Perera OP, Michel FJ, Simmen RC. Multiple upstream promoter elements of the gene for the pregnancy-associated tartrate-resistant acid phosphatase, uteroferrin bind human endometrial nuclear proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;108:51-65.
- Gordon LR, Sartin EM. Endometrial Biopsy as an Aid to Diagnosis and Prognosis in Equine Infertility. *J Equine Med Surg.* 1978;2:328-36.
- Gorecka A, Jezierski TA, Sloniewski K. Relationships between sexual behaviour, dominant follicle area, uterus ultrasonic image and pregnancy rate in mares of two breeds differing in reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci.* 2005;87:283-93.
- Griffin PG, Ginther OJ. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology.* 1990;34:47-56.
- Griffin PG, Ginther OJ. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. *Theriogenology.* 1993;39:997-1008.

- Grimmett JB, Hanlon DW, Duris GF, Jochle W. A new intra-vaginal progesterone-releasing device (Cue-Mare (TM)) for controlling the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002;58:585-7.
- Gross TS, Mirando MA, Young KH, Beers S, Bazer FW, Thatcher WW. Reorientation of Prostaglandin-F Secretion by Calcium Ionophore, Estradiol, and Prolactin in Perifused Porcine Endometrium. *Endocrinology*. 1990;127:637-42.
- Grosser O. Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen. Wien: Verlag Braumüller; 1909.
- Grüninger B, Schoon H-A, Schoon D, Menger S, Klug E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares with relationship to age and parity. *J Comp Pathol*. 1998;119:293-309.
- Grüninger BU. Zur Pathogenese von Angiopathien im Endometrium der Stute - Morphologisch-funktionelle Untersuchungen - [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1996.
- Häfner I. Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1999.
- Halleen JM, Raisanen SR, Alatalo SL, Vaananen HK. Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. *J Bone and Miner Res*. 2003;18:1908-11.
- Hansen PJ. Regulation of immune cells in the uterus during pregnancy in ruminants. *J Anim Sci*. 2007;85 Suppl 13:E30-1.
- Hart PJ, Squires EL, Imel KJ, Nett TM. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol Reprod*. 1984;30:1055-62.
- Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*. 2005;130:241-50.
- Hayes MA, Quinn BA, Keirstead ND, Katavolos P, Waelchli RO, Betteridge KJ. Proteins associated with the early intrauterine equine conceptus. *Reprod Domest Anim*. 2008;43 Suppl 2:232-7.
- Hayes MA, Quinn BA, Lillie BN, Côté O, Bienzle D, Waelchli RO et al. Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. *Anim Reprod*. 2012;9:723-41.
- Hayman AR, Cox TM. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*. 2003;18:1905-7.
- Hedberg Y, Dalin AM, Forsberg M, Lundeheim N, Sandh G, Hoffmann B et al. Effect of ACTH (tetracosactide) on steroid hormone levels in the mare - Part B: Effect in ovariectomized mares (including estrous behavior). *Anim Reprod Sci*. 2007;100:92-106.

- Hedberg Y, Dalin AM, Santesson M, Kindahl H. A preliminary study on the induction of dioestrous ovulation in the mare - a possible method for inducing prolonged luteal phase. *Acta Vet Scand.* 2006;48.
- Hegele-Hartung C, Beier HM. Distribution of uteroglobin in the rabbit endometrium after treatment with an anti-progesterone (ZK 98.734): an immunocytochemical study. *Hum Reprod.* 1986;1:497-505.
- Heilkenbrinker T, Kossin C, Scherbarth R, Frerking H. A field study to evaluate the efficacy of case historical and clinical parameters in increasing the precision of predicting the course of subsequent pregnancy. *Deut Tierarztl Woch.* 1997;104:313-6.
- Hein K. Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2001.
- Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;70:101-13.
- Henderson ISF, Brama P, Osborne M, Beltman ME. Interovulatory intervals in mares receiving deslorelin implants in Ireland (2009 to 2010). *Vet Rec.* 2012;170.
- Herrler A, Stewart F, Crossett B, Pell JM, Ellis PD, Beier HM et al. Identification of proteins in the equine embryonic capsule. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;601-6.
- Hewetson A, Chilton BS. Novel elements in the uteroglobin promoter are a functional target for prolactin signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;136:1-6.
- Hinrichs K, Kenney RM. Differences in protein content of uterine fluid related to duration of progesterone treatment in ovariectomised mares used as embryo recipients. *Equine Vet J Suppl.* 1989;8:49-55.
- Hoffmann C. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometrose unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2006.
- Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Aupperle H, Ellenberger C, Özgen S et al. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare. *Pferdeheilkunde.* 2009a;25:212-9.
- Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B et al. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci.* 2009b;111:261-78.
- Holm LA, Jespersen C. Intrauterine kobberkuglers effect på hoppens østralcyklus (Effect of copper balls on mare's oestrous cycle). *Speciale.* KVL, Dänemark; 2003.
- Hooper RN, Taylor TS, VARNER DD, Blanchard TL. Effects of Bilateral Ovariectomy Via Colpotomy in Mares - 23 Cases (1984-1990). *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:1043-6.
- Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JRA, Dominguez F, Burgos LA et al. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3199-207.

- Hurtgen JP, Ganjam VK. The effect of intrauterine and cervical manipulation on the equine oestrous cycle and hormone profiles. *J Reprod Fertil Suppl.* 1979;191-7.
- Hurtgen JP, Whitmore HL. Effects of endometrial biopsy, uterine culture, and cervical dilatation on the equine estrous cycle. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;173:97-100.
- Imboden I, Janett F, Burger D, Crowe MA, Hassig M, Thun R. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology.* 2006;66:1866-75.
- Janakiraman K, Casida LE. Ovulation Corpora Lutea Development and Pituitary LH Activity in Rabbits with Intra-Uterine Devices. *J Reprod Fertil.* 1968;15:395-9.
- Janakiraman K, Woody CO, Agarwal SP, Bhalla RC, Shukla KP, Gadgil BA et al. Interference with reproduction in water buffalo by intra-uterine devices. *J Reprod Fertil.* 1970;22:499-507.
- Janckila AJ, Lin HF, Wu YY, Ku CH, Yang SP, Lin WS et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a (TRACP5a) as a potential risk marker in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2011;412:963-9.
- Janckila AJ, Yam LT. Biology and Clinical Significance of Tartrate-Resistant Acid Phosphatases: New Perspectives on an Old Enzyme. *Calcif Tissue Int.* 2009;85:465-83.
- Jischa S, Walter I, Nowotny N, Palm F, Budik S, Kolodziejek J et al. Uterine involution and endometrial function in postpartum pony mares. *Am J Vet Res.* 2008;69:1525-34.
- Johnson CA, Thompson DL, Kulinski KM, Guitreau AM. Prolonged interovulatory interval and hormonal changes in mares following the use of Ovuplant (TM) to hasten ovulation. *J Equine Vet Sci.* 2000;20:331-6.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 1993;268:9049-54.
- Jorgensen JS, Vivrette S, Correa M, Mansmann RA. Significance of the estrous cycle on athletic performance in mares. Denver: 1996. p. 98-100.
- Joshi SG. Effects of an intra-uterine foreign body (IUFB) on glycogen accumulation and lysosomal enzyme activity in rat uterus. *J Reprod Fertil.* 1969;18(1):170-1.
- Kalpokas I, Perdigon F, Rivero R, Talmon M, Sartore I, Vinales C. Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. *Acta Vet Scand.* 2010;52:66.
- Kamm JL, Hendrickson DA. Clients' perspectives on the effects of laparoscopic ovariectomy on equine behavior and medical problems. *J Equine Vet Sci.* 2007;27:435-8.
- Kaspar B, Kahn W, Laging C, Leidl W. Endometrial cysts in the mare. 1. Post-mortem studies: occurrence and morphology. *Tierarztl Prax.* 1987;15:161-6.
- Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:197-204.

- Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim.* 2012;47 Suppl 5:31-41.
- Keith L, Ball BA, Scoggin K, Esteller-Vico A, Woodward EM, Troedsson MH et al. Diestrus administration of oxytocin prolongs luteal maintenance and reduces plasma PGFM concentrations and endometrial COX-2 expression in mares. *Theriogenology.* 2013;79:616-24.
- Kennedy MW. Uterocalin-provider of essential lipids and amino acids to the pre-placentation equine conceptus. *Havemeyer Found Monogr Ser.* 2005;16:53-6.
- Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172:241-62.
- Kenney RM. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: J.P. Hughes, Hrsg. Workshop on equine endometritis. Newmarket, U.K. *Equine Vet J.* 1992; 25:186
- Kenney RM, Doig PA. Equine Endometrial Biopsy. In: Morrow DA, editor. *Current Therapy in Theriogenology.* 2nd. Aufl. Philadelphia: WB Saunders; 1986. S. 723-9.
- Ketcham CM, Baumbach GA, Bazer FW, Roberts RM. The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification, properties, immunological characterization, and comparison with porcine uteroferrin. *J Biol Chem.* 1985;5768-76.
- Kikukawa T, Cowan BD, Tejada RI, Mukherjee AB. Partial characterization of a uteroglobin-like protein in the human uterus and its temporal relationship to prostaglandin levels in this organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:315-21.
- Killian G, Thain D, Diehl NK, Rhyan J, Miller L. Four-year contraception rates of mares treated with single-injection porcine zona pellucida and GnRH vaccines and intrauterine devices. *Wildl Res.* 2008;35:531-9.
- Klein C, Troedsson M. Equine pre-implantation conceptuses express neuraminidase 2--a potential mechanism for desialylation of the equine capsule. *Reprod Domest Anim.* 2012;47:449-54.
- Klein C, Troedsson MH. Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23:952-63.
- Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N, Singh G. Uteroglobin/Clara Cell 10kDa family of proteins: Nomenclature Committee Report. In: Mukherjee AB, Chilton BS, Hrsg. *The uteroglobin/Clara Cell protein family;* 2000. p. 348-53.
- Knudsen ODD, Velle W. Ovarian oestrogen levels in the non-pregnant mare: Relationship to histological appearance of the uterus and to clinical status. *J Reprod Fertil.* 1961;2:130-7.
- Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I et al. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology.* 2008;70:1147-58.

- Korte K, Marzusch K, Dietl J. The production of prostanoids and the identification of macrophages in human decidua vera tissue. *Arch Gynecol Obstet*. 1993;252:149-54.
- Krishnan RS, Daniel JC, Jr. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science*. 1967;158:490-2.
- Krusche CA. Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zur Differenzierung des Endometriumepithels: Eine Studie mit Progesteron-Antagonisten. Aachen: Shaker Verlag; 1999.
- Lamming GE, Wathes DC, Flint AP, Payne JH, Stevenson KR, Vallet JL. Local action of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J Reprod Fertil*. 1995;105:165-75.
- Laurenz JC, Hadjisavvas M, Chovanic GW, Bazer FW. Myelosuppression in the pig (*Sus scrofa*): uteroferrin reduces the myelosuppressive effects of 5-fluorouracil in young pigs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1997;116A:369-77.
- Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction*. 2007;134:389-404.
- LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim*. 2010;45 Suppl 2:21-7.
- LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim*. 2009;44 Suppl 3:10-22.
- Lefranc AC, Allen WR. Nonpharmacological suppression of oestrus in the mare. *Equine Vet J*. 2004;36:183-5.
- Lesur O, Bernard A, Arsalane K, Lauwerys R, Begin R, Cantin A et al. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:290-7.
- Levin SW, Butler JD, Schumacher UK, Wightman PD, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity. *Life Sci*. 1986;38:1813-9.
- Liebich H. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4 Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2004.
- Ling P, Roberts RM. Overexpression of uteroferrin, a lysosomal acid phosphatase found in porcine uterine secretions, results in its high rate of secretion from transfected fibroblasts. *Biol Reprod*. 1993a;49:1317-27.
- Ling P, Roberts RM. Uteroferrin and intracellular tartrate-resistant acid phosphatases are the products of the same gene. *J Biol Chem*. 1993b;268:6896-902.
- Linnoila RI, Szabo E, DeMayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A. The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: From a marker to tumor suppression. *Uteroglobin/Clara Cell Protein Family*. 2000;923:249-67.
- Lippes J. Contraception with intrauterine plastic loops. *Am J Obstet Gynecol*. 1965;93:1024-30.

- Liu IK. Uterine defense mechanisms in the mare. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4:221-8.
- Loy RG, Swan SM. Effects of Exogenous Progestogens on Reproductive Phenomena in Mares. *J Anim Sci.* 1966;25:821-6.
- Lyle SK, Sun L, Taylor V, Oostelaar E, Perry R, Dietrich M et al. Isolation and characterization of equine endometrial macrophage and dendritic cell populations. 7th International Conference on Equine Reproduction Medicine. Leipzig, Germany, January 2012
- Machnik M, Hegger I, Kietzmann M, Thevis M, Guddat S, Schanzer W. Pharmacokinetics of altrenogest in horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007;30:86-90.
- Manjunath R, Chung SI, Mukherjee AB. Crosslinking of uteroglobin by transglutaminase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;121:400-7.
- Manjunath R, Levin SW, Kumaroo KK, Butler JD, Donlon JA, Horne M et al. Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation by uteroglobin. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:741-6.
- Martin PM, Brown JB. The effect of intrauterine contraceptive devices on ovarian and menstrual function in the human. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;36:1125-31.
- McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology.* 1993;22:543-7.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 1999;79:263-323.
- McCue PM, Scoggin CF, Lindholm ARG. Estrus. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction.* 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2012. p. 1716-27.
- McDowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS. Changes in equine endometrial oestrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J Reprod Fertil.* 1999;117:135-42.
- McDowell KJ, Sharp DC, Fazleabas A, Roberts RM, Bazer FW. Partial characterization of the equine uteroferrin-like protein. *J Reprod Fertil Suppl.* 1982;32:329-34.
- McDowell KJ, Sharp DC, Fazleabas AT, Roberts RM. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized by conceptuses and endometria from pony mares. *J Reprod Fert.* 1990;89:107-15.
- McDowell KJ, Sharp DC, Grubbaugh W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 1987;35:335-42.
- McDowell KJ, Sharp DC, Grubbaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod.* 1988;39:340-8.

- Meinecke B. Reproduktion. In: von Engelhardt W, Breves G, Hrsg. Physiologie der Haustiere. 2. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2005. S. 495-551.
- Melrose PA, Pickel C, Cheramie HS, Henk WG, Littlefield-Chabaud MA, French DD. Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies. *J Comp Neurol*. 1994;339:269-87.
- Merkl M, Ulbrich SE, Otdorff C, Herbach N, Wanke R, Wolf E et al. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. *Biol Reprod*. 2010;83:874-86.
- Meyer JC. Brunstecykklus hos hopper efter indlæggelse af intrauterin sølv- eller glaskugle (Oestrus cycle of mares after placement of an intrauterine silver or copper ball). Speciale. KVL, Danmark; 2003.
- Mishell DR, Jr., Bell JH, Good RG, Moyer DL. The intrauterine device: a bacteriologic study of the endometrial cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;96:119-26.
- Mitchell G, Liu IK, Perryman LE, Stabenfeldt GH, Hughes JP. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium--a mucosal immune system. *J Reprod Fertil Suppl*. 1982;32:161-8.
- Morel MCGD, Newcombe JR, Holland SJ. Factors affecting gestation length in the thoroughbred mare. *Anim Reprod Sci*. 2002;74:175-85.
- Morize I, Surcouf E, Vaney MC, Epelboin Y, Buehner M, Fridlansky F et al. Refinement of the C222(1) crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution. *J Mol Biol*. 1987;194:725-39.
- Mornon JP, Fridlansky F, Bally R, Milgrom E. X-ray crystallographic analysis of a progesterone-binding protein. The C2221 crystal form of oxidized uteroglobin at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*. 1980;137:415-29.
- Mukherjee AB, Ulane RE, Agrawal AK. Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the antigenicity of implanting rabbit embryos. *Am J Reprod Immunol*. 1982;2:135-41.
- Mukherjee AB, Zhang ZJ, Chilton BS. Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocr Rev*. 2007;28:707-25.
- Mukherjee DC, Agrawal AK, Manjunath R, Mukherjee AB. Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro. *Science*. 1983;219:989-91.
- Müller-Schöttle FM, Bogusz A, Grötzinger J, Herrler A, Krusche CA, Beier-Hellwig K et al. Full-length complementary dna and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin. *Biol Reprod*. 2002;66:1723-8.
- Müller-Schöttle FM, Bogusz A, Herrler A, Bollwein H, Beier-Hellwig K, Beier HM. Cloning of horse uteroglobin and its expression pattern in the endometrium. 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 26. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Gießen; Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; 2001. p. 83.

- Mumford EL, Squires EL, Jochle E, Harrison LA, Nett TM, Trigg TE. Use of Deslorelin Short-Term Implants to Induce Ovulation in Cycling Mares During 3 Consecutive Estrous Cycles. *Anim Reprod Sci.* 1995;39:129-40.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999;189:1363-72
- Murray FA, Jr., Bazer FW, Wallace HD, Warnick AC. Quantitative and qualitative variation in the secretion of protein by the porcine uterus during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 1972;7:314-20.
- Murray MK, Malathy PV, Bazer FW, Roberts RM. Structural relationship, biosynthesis, and immunocytochemical localization of uteroferrin-associated basic glycoproteins. *J Biol Chem.* 1989;264:4143-50.
- Nalbandov AV, Moore WW, Norton HW. Further Studies on the Neurogenic Control of the Estrous Cycle by Uterine Distention. *Endocrinology.* 1955;56:225-31.
- Neely DP, Stabenfeldt GH, Sauter CL. Effect of Exogenous Oxytocin on Luteal Function in Mares. *J Reprod Fertil.* 1979;55:303-8.
- Nett TM, Pickett BW, Seidel GE, Voss JL. Levels of Luteinizing-Hormone and Progesterone During Estrous-Cycle and Early-Pregnancy in Mares. *Biol Reprod.* 1976;14:412-5.
- Ni J, Kalff-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:25-42.
- Nie GJ, Johnson KE, Braden TD, Wenzel JGW. Use of an intra-uterine glass ball protocol to extend luteal function in mares. *J Equine Vet Sci.* 2003a;23:266-73.
- Nie GJ, Johnson KE, Wenzel JGW, Braden TD. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. *Theriogenology.* 2003b;60:1111-8.
- Noden PA, Oxender WD, Hafs HD. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;189-92.
- Noronha LE, Antczak DF. Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64:231-44.
- Noske IG, Feigelson M. Immunological evidence of uteroglobin (blastokinin) in the male reproductive tract and in nonreproductive ductal tissues and their secretions. *Biol Reprod.* 1976;15:704-13.
- Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, De Jersey J et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone.* 2000;27:575-84.
- Oikawa M, Katayama Y, Yoshihara T, Kaneko M, Yoshikawa T. Microscopical characteristics of uterine wall arteries in barren aged mares. *J Comp Pathol.* 1993;108:411-5.

- Oriol JG, Betteridge KJ, Clarke AJ, Sharom FJ. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. *Mol Reprod Dev.* 1993;34:255-65.
- Ortiz ME, Croxatto HB, Bardin CW. Mechanisms of action of intrauterine devices. *Obstet Gynecol Surv.* 1996;51:S42-S51.
- Özgen S, Rasch K, Kropp G, Schoon HA, Aupperle H, Sieme H. Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde.* 1997;13:533-6
- Özgen S. Die Hydromukometra bei der Stute. Untersuchungen zur Ätiopathogenese, diagnostischen Differenzierung und therapeutischen Beeinflussbarkeit. [Dissertation med.vet]. Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 1999.
- Özgen S, Schoon HA, Aupperle H, Sieme H, Klug E. Etiopathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. *Pferdeheilkunde.* 2002;18:594-9.
- Padua MB, Lynch VJ, Alvarez NV, Garthwaite MA, Golos TG, Bazer FW et al. ACP5 (Uteroferrin): phylogeny of an ancient and conserved gene expressed in the endometrium of mammals. *Biol Reprod.* 2012;86:123.
- Pallaske G, Schmiedel E. Pathologisch-histologische Technik. Berlin Hamburg: Parey Buchverlag; 1959
- Palm F, Walter I, Budik S, Kolodziejek J, Nowotny N, Aurich C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology.* 2008;70:843-51.
- Palmer SE. Standing laparoscopic laser technique for ovariectomy in five mares. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:279-83.
- Parr EL, Schaedler RW, Hirsch JG. The relationship of polymorphonuclear leukocytes to infertility in uteri containing foreign bodies. *J Exp Med.* 1967;126:523-38.
- Pattabiraman N, Matthews JH, Ward KB, Mantile-Selvaggi G, Miele L, Mukherjee AB. Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:113-27.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol.* 2000;165:359-70.
- Peri A, Bonaccorsi L, Muratori M, Luconi M, Baldi E, Granchi S et al. Uteroglobin reverts the transformed phenotype in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A by disrupting the metabolic pathways generating platelet-activating factor. *Int J Cancer.* 2000;88:525-34.
- Portus BJ, Reilas T, Katila T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Vet J.* 2005;37:515-9.
- Pschyrembel W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 260. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter; 2006.

Pycock JF, Newcombe JR. Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. *Vet Rec.* 1996;138:320-3.

Qiu Y, Wang LG, Zhang MH, Zhang YP, Zhang AD, Yang DT. A new experimental three-dimensional, reticular intrauterine device (3-DRIUD) composed of nitinol and silicone rubber. *Contraception.* 2013;88:31-6.

Quetin M. Klinisch-gynäkologische und histopathologische untersuchungen zur Beurteilung der endometrialen Reaktion auf besamungsrelevante Medien (Samenverdünner, Seminalplasma, Spermien) bei Warmblutstuten [Dissertation med.vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2001.

Quetin M, Beuke C, Klug E, Schoon HA, Aupperle H, Schoon D et al. Effects of spermatozoa, seminal plasma and extender on postbreeding endometritis in mares. *Pferdeheilkunde.* 2001;17:682-3.

Raeside JJ, Christie HL, Waelchli RO, Betteridge KJ. Biosynthesis of oestrogen by the early equine embryo proper. *Reprod Fertil Dev.* 2012;24:1071-8.

Raila G. Zur Pathogenese der Endometrose der Stute - Morphologisch-funktionelle Untersuchungen [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.

Raila G, Schoon H-A, Schoon D, Özgen S, Aupperle H, Klug E et al. The equine endometrial cycle: a morphometrial, ultrastructural, enzyme- and immuno-histological investigation. *J Animal Sci Suppl.* 1997;1:231.

Raisanen SR, Alatalo SL, Ylipahkala H, Halleen JM, Cassady AI, Hume DA et al. Macrophages overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase show altered profile of free radical production and enhanced capacity of bacterial killing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:120-6.

Randall GW, Daniel JC, Jr., Chilton BS. Prolactin enhances uteroglobin gene expression by uteri of immature rabbits. *J Reprod Fertil.* 1991;91:249-57.

Raz T, Carley SD, Green JM, Card CE. Evaluation of two oestrus synchronization regimens in eFSH-treated donor mares. *Vet J.* 2011;188:105-9.

Reilas T, Katila T. Proteins and enzymes in uterine lavage fluid of postpartum and nonparturient mares. *Reprod Domest Anim.* 2002;37:261-8.

Richter R. Ein Mittel zur Verhütung der Konzeption. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 1909;35:1525-7.

Ricketts SW. The barren mare: diagnosis, prognosis, prophylaxis and treatment for genital abnormality. Part 2. *In Pract.* 1989;11:156-64.

Ricketts SW, Alonso S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet J.* 1991;23:189-92.

Ricketts SW, Barrelet A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. *Pferdeheilkunde.* 1997;13:525-30.

- Rivera del Alamo MMR, Reilas T, Kindahl H, Katila T. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:94-106.
- Roberts RM, Bazer FW. The functions of uterine secretions. *J Reprod Fertil.* 1988;82:875-92.
- Romeis B. *Mikroskopische Technik.* 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
- Rossdale PD, Ricketts SW. *Equine stud farm medicine.* 2. Aufl. Eastborne: Baillere Tindall; 1980.
- Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Berlin: Paul Parey Verlag; 1991
- Sagioglu N, Sagioglu E. Biologic mode of action of the Lippes loop in intrauterine contraception. *Am J Obstet Gynecol.* 1970;106:506-15.
- Samuel CA, Allen WR, Steven DH. Studies on Equine Placenta. I. Development of Microcotyledons. *J Reprod Fertil.* 1974;41:441-5.
- Sandmöller A, Voss AK, Hahn J, Redemann-Fibi B, Suske G, Beato M. Cell-specific, developmentally and hormonally regulated expression of the rabbit uteroglobin transgene and the endogenous mouse uteroglobin gene in transgenic mice. *Mech Dev.* 1991;34:57-67.
- Saunders PT, Renegar RH, Raub TJ, Baumbach GA, Atkinson PH, Bazer FW et al. The carbohydrate structure of porcine uteroferrin and the role of the high mannose chains in promoting uptake by the reticuloendothelial cells of the fetal liver. *J Biol Chem.* 1985;260:3658-65.
- Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol.* 1992;168:161-2.
- Schlafer DH. Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology.* 2007;68:413-22.
- Schlosnagle DC, Bazer FW, Tsibris JC, Roberts RM. An iron-containing phosphatase induced by progesterone in the uterine fluids of pigs. *J Biol Chem.* 1974;249:7574-9.
- Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123:513-22.
- Schoon D, Schoon HA, Klug E. Angiopathien im Endometrium der Stute: Diagnose und prognostische Bedeutung. DVG-Tagungsbericht der 13. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten; 1994 Mar 24-25; Wiesbaden, Germany. Giessen: DVG; 1994a. p. 17-28
- Schoon HA, Schoon D. The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde.* 2003;19:698-701.
- Schoon HA, Schoon D, Klug E. Uterusbiopsien als diagnostisches Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde.* 1992;8:355-62.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Klinische Pathologie, Diagnostik und Terminologie endometrial bedingter Fertilitätsstörungen beim Pferd. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hrsg. DVG-Tagungsbericht, 13. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten; 1994 Mar 24-25; Wiesbaden. 1994b. p. 1-16.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde*. 1997;13:453-64.

Schoon HA, Schoon D, Kötter B, Runge A, Klug E. Zu Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hrsg. 21. DVG-Kongress Bad Nauheim; 1995 Mar 21; 1995. p. 273-82.

Schoon HA, Schoon D, Ohnesorge B, Klug E. Zu Diagnose, Pathogenese und Bedeutung endometrialer Zysten bei der Stute. *Pferdeheilkunde*. 1993;9:215-21.

Schulman ML, Botha AE, Muenscher SB, Annandale CH, Guthrie AJ, Bertschinger HJ. Reversibility of the effects of GnRH-vaccination used to suppress reproductive function in mares. *Equine Vet J*. 2013;45:111-3.

Schulz S. Untersuchungen zu Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von Mastzellen im Endometrium der Stute Leipzig: Universität Leipzig; 1997.

Scott EA, Kunze DJ. Ovariectomy in Mare - Presurgical, Surgical and Postsurgical Considerations. *J Equine Med Surg*. 1977;1:5-12.

Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van NS, Price Y, Lane DP et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol*. 1991;165:173-8.

Sharma S, Dhaliwal GS, Gosal NS, Varun. The impact of uterine therapies on reproductive efficiency in Thoroughbred mares; the possible effect of mare age and reproductive status. *Veterinarski Arhiv*. 2011;81:163-73.

Sharp DC. Vernal transition into the breeding season. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction*. 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 1704-15.

Sharp DC, Thatcher MJ, Salute ME, Fuchs AR. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. *J Reprod Fertil*. 1997;109:137-44.

Shen XZ, Tsai MJ, Bullock DW, Woo SL. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. *Endocrinology*. 1983;112:871-6.

Short RV. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: O'Conner M, editor. *Ciba Foundation Symposium on foetal Autonomy*. London: Wolstenholme GEW; 1969. S. 2-26.

Silva LA, Klein C, Ealy AD, Sharp DC. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*. 2011;142:593-603.

- Simmen RC, Simmen FA, Bazer FW. Regulation of synthesis of uterine secretory proteins: evidence for differential induction of porcine uteroferrin and antileukoproteinase gene expression. *Biol Reprod.* 1991;44:191-200.
- Sirois J, Simmons DL, Richards JS. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 1992;267:11586-92.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996;271:33157-60.
- Smits K, Govaere J, Peelman LJ, Goossens K, de G, Vercauteren D et al. Influence of the uterine environment on the development of in vitro-produced equine embryos. *Reproduction.* 2012;143:173-81.
- Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology.* 2011;75:1567-81.
- Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-3:537-50.
- Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP, Ginther OJ. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *J Anim Sci.* 1974;38:330-8.
- Stabenfeldt GH, Hughes JP, Evans JW. Ovarian activity during the estrous cycle of the mare. *Endocrinology.* 1972;90:1379-84.
- Starbuck GR, Stout TA, Lamming GE, Allen WR, Flint AP. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1998;113:173-9.
- Stewart F, Charleston B, Crossett B, Barker PJ, Allen WR. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. *J Reprod Fertil.* 1995;105:65-70.
- Stewart F, Gerstenberg C, Suire S, Allen WR. Immunolocalization of a novel protein (P19) in the endometrium of fertile and subfertile mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000a;593-9.
- Stewart F, Kennedy MW, Suire S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. *Cell Mol Life Sci.* 2000b;57:1373-8.
- Stief B. Heilungsvorgänge am Uterus der Stute nach minimalinvasiven chirurgischen Eingriffen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2004.
- Stoeckelhuber M, Messmer EM, Schmidt C, Xiao F, Schubert C, Klug J. Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues. *Histochem Cell Biol.* 2006;126:103-9.
- Stout TA, Allen WR. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction.* 2001;121:771-5.
- Stout TAE. Prostaglandins. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction.* 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 1642-7.

- Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E-2 and F-2 alpha production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*. 2002;123:261-8.
- Strahl H. Die Embryonalhüllen der Säuger und die Placenta. In: Hertwig O, Hrsg. *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere* Band 1. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1906.
- Strankmeyer O. Morphometrische Untersuchungen am Endometrium zyklischer und ovariektomierter, hormonbehandelter Stuten [Dissertation med. vet.]. Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 1993.
- Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282:11613-7.
- Suire S, Stewart F, Beauchamp J, Kennedy MW. Uterocalin, a lipocalin provisioning the pre-attachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem J*. 2001;356:369-76.
- Summerfield NJ, Watson ED. Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis. *Equine Vet J*. 1998;30:79-81.
- Tanaka R, Saito T, Shijubo N, Takehara M, Yamada G, Kawabata I et al. Expression of uteroglobin in normal and carcinogenic endometrium and influence of hormone replacement therapy. *Int J Cancer*. 2004;109:43-8.
- Tomanelli RN, Sertich PL, Watson ED. Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991;44:267-73.
- Troedsson MH. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999;52:461-71.
- Troedsson MH, Ababneh MM, Ohlgren AF, Madill S, Vetscher N, Gregas M. Effect of periovulatory prostaglandin F2alpha on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology*. 2001;55:1891-9.
- Trum BF. The Estrous Cycle of the Mare. *Cornell Vet*. 1950;40:17-23.
- Turin EM, Nagle CA, Lahoz M, Torres M, Turin M, Mendizabel AF et al. Effects of a copper-bearing intrauterine device on the ovarian function, body weight gain and pregnancy rate of nulliparous heifers. *Theriogenology*. 1997;47:1327-36.
- Vagnoni KE, Ginther OJ, Lunn DP. Metalloproteinase activity has a role in equine chorionic girdle cell invasion. *Biol Reprod*. 1995;53:800-5.
- Vallet JL, Christenson RK, McGuire WJ. Association between uteroferrin, retinol-binding protein, and transferrin within the uterine and conceptus compartments during pregnancy in swine. *Biol Reprod*. 1996;55:1172-8.
- Van Camp SD. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1988;4:229-45.

- Van Oostveen DC, van den Berg TK, Damoiseaux JG, van Rees EP. Macrophage subpopulations and reticulum cells in rat placenta. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 1992;268:513-9.
- Vanderwall DK. Progesteron. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction*. 2. Aufl. Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 1637-41.
- Vanderwall DK, Nie GJ. Estrus Suppression. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction*. 2. Aufl. Wiley-Blackwell; 2011. p. 1845-53.
- Vanderwall DK, Rasmussen DM, Woods GL. Effect of repeated administration of oxytocin during diestrus on duration of function of corpora lutea in mares. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;231:1864-7.
- Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, Schiffmann E. Inhibition of phagocyte chemotaxis by uteroglobin, an inhibitor of blastocyst rejection. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:389-94.
- Villani M, van Tol HTA, Stout TAE. Expression of mRNA for Cyclooxygenase-2 (COX2), Oxytocin Receptors (OTR) and PGF2 alpha Receptors (PGFR) in the Endometrium of Cycling and Early Pregnant Mares. *Reprod Dom Anim.* 2008;43:93.
- Vogel HJ, Humke E. Cyclic changes in the shape of the mare's uterine glands as compared with those of other mammals and man. *Zentralbl Veterinaarmed [B]*. 1973;271-9.
- Waelchli RO, Winder NC. Die Biopsie der Uterusschleimhaut bei der Stute zur Ergänzung der Zuchtauglichkeitsuntersuchung. *Schweiz Arch Tierh.* 1987;129:399-415.
- Waelchli RO, Winder NC. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. *Equine Vet J.* 1991;23:470-4.
- Walter I, Klein M, Handler J, Aurich JE, Reifinger M, Aurich C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *Am J Vet Res.* 2001;62:840-5.
- Walters KW, Roser JF, Anderson GB. Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor 1. *Reproduction.* 2001;121:331-8.
- Washburn SM, Klesius PH, Ganjam VK, Brown BG. Effect of estrogen and progesterone on the phagocytic response of ovariectomized mares infected in utero with beta-hemolytic streptococci. *Am J Vet Res.* 1982;43:1367-70.
- Watson ED. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. *Equine Vet J.* 1988;20:397-400.
- Watson ED, Dixon CE. An Immunohistological Study of MHC Class-II Expression and T-Lymphocytes in the Endometrium of the Mare. *Equine Vet J.* 1993;25:120-4.
- Watson ED, Hinrichs K. Adrenal Production of Sex Steroids in the Mare. *Theriogenology.* 1989;32:913-9.
- Watson ED, Pedersen HG, Thomson SR, Fraser HM. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology.* 2000;54:599-609.

- Watson ED, Sertich PL. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *J Reprod Fertil*. 1989;87:331-6.
- Watson ED, Sertich PL. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. *J Am Vet Med Assoc*. 1992;201:438-40.
- Watson ED, Skolnik SB, Zanecosky HG. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology*. 1992;38:575-80.
- Watson ED, Stokes CR. Plasma cell numbers in uteri of mares with persistent endometritis and in ovariectomised mares treated with ovarian steroids. *Equine Vet J*. 1988;20:424-5.
- Watson ED, Stokes CR, David JS, Bourne FJ. Effect of ovarian hormones on promotion of bactericidal activity by uterine secretions of ovariectomized mares. *J Reprod Fertil*. 1987a;79:531-7.
- Watson ED, Stokes CR, David JS, Bourne FJ, Ricketts SW. Concentrations of uterine luminal prostaglandins in mares with acute and persistent endometritis. *Equine Vet J*. 1987b;19:31-7.
- Watson ED, Thomson SR. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Vet J*. 1996;28:106-10.
- Webel SK, Franklin V, Harland B, Dzuik PJ. Fertility, Ovulation and Maturation of Eggs in Mares Injected with HCG. *J Reprod Fertil*. 1977;51:337-41.
- Webel SK, Squires EL. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *J Reprod Fertil Suppl*. 1982;32:193-8.
- Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin-E2 Secretion by Oviducal Transport-Stage Equine Embryos. *Biol Reprod*. 1991;45:540-3.
- Weber JA, Woods GL, Freeman DA, Vanderwall DK. Prostaglandin E2 secretion by day-6 to day-9 equine embryos. *Prostaglandins*. 1992;43:55-9.
- Welle MM, Audige L, Belz JP. The equine endometrial mast cell during the puerperal period: Evaluation of mast cell numbers and types in comparison to other inflammatory changes. *Vet Pathol*. 1997;34:23-30.
- Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. 2. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag; 2006.
- World Health Organization (WHO). Intra-uterine devices: physiological and clinical aspects. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1968;397:1-32
- Williams GL, Thorson JF, Prezotto LD, Velez IC, Cardoso RC, Amstalden M. Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domest Anim Endocrinol*. 2012;43:103-15.
- Williamson P, Munyua S, Martin R, Penhale WJ. Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987;35:317-25.

Wilsher S, Gower S, Allen WR. Immunohistochemical localisation of progesterone and oestrogen receptors at the placental interface in mares during early pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2011;129:200-8.

Witte TS, Melkus E, Walter I, Senge B, Schwab S, Aurich C et al. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in oestrous mares. *Theriogenology.* 2012;78:1199-208.

Wooding FB, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta.* 2001;22:749-67.

Wooding FBP, Morgan G, Fowden AL, Allen WA. Separate sites and mechanisms for placental transport of calcium, iron and glucose in the equine placenta. *Placenta.* 2000;21:635-45.

Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MH. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology.* 2012;78:495-501.

Zavy JT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, SHARP DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 1979a;403-11.

Zavy MT, Bazer FW, SHARP DC, Wilcox CJ. Uterine luminal proteins in the cycling mare. *Biol Reprod.* 1979b;20:689-98.

Zavy MT, Sharp DC, Bazer FW, Fazleabas A, Sessions F, Roberts RM. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1982;64:199-207.

9 ANHANG

9.1 Charakterisierung des Tiergutes

Tab. 9.1: Charakterisierung der künstlich besamten Stuten ($n = 15$; Gruppe A) unter Berücksichtigung der histomorphologischen endometrialen Befunde

ID	Gr.	Alter (Jahre)	Endometritis (Grad, Alter, Charakter, Verteilung)	Endometrose (Grad, Form)	Angio- sklerose	Kat.
3	1	9	-	ggr., aktiv	ggr.	II a
5	1	5	-	ggr., inaktiv	-	II a
8	1	6	-	ggr., inaktiv	ggr.	II a
12	1	5	ggr., chronisch, nicht-eitrig, oberfl.	-	-	II a
20	1	4	-	ggr., inaktiv	ggr.	II a
23	1	7	-	ggr., gemischt	-	II a
24	1	4	ggr., akut, eitrig, oberfl.	-	ggr.	II a
25	1	9	-	-	-	I
10	2	16	-	mgr., aktiv, destruierend	mgr.	II b
11	2	4	ggr., chronisch, nicht-eitrig, oberfl.	ggr., aktiv	ggr.	II b
18	2	13	-	ggr., aktiv, destruierend	mgr.	II a
27	2	16	-	mgr., gemischt, destruierend	mgr.	II b
29	2	29	ggr., chronisch, nicht-eitrig, oberfl.	mgr., aktiv	-	III
242	2	14	-	mgr., inaktiv	ggr.	II b
243	2	7	-	ggr., aktiv, destruierend	-	II a

Legende zu Tab. 9.1: ID: Stuten-Identifikationsnummer, Gr.: Gruppe, 1: KB/tragend, 2: KB/zyklisch, KB: künstlich besamt, 3: IUD/verlängerte luteale Phase, 4: IUD/reguläre luteale Phase, IUD: intrauterine device, ggr: geringgradig, mgr: mittelgradig, hgr: hochgradig, oberfl.: oberflächlich, Kat.: Kategorie

Tab. 9.2: Charakterisierung der Stuten ($n = 15$; Gruppe B) mit intrauterinem Ball (IUD) unter Berücksichtigung der histomorphologischen endometrialen Befunde

ID	Gr.	Alter (Jahre)	Endometritis (Grad, Alter, Charakter, Verteilung)	Endometrose (Grad, Form)	Angio- sklerose	Kat.
1	3	15	-	mgr., gemischt	ggr.	II b
2	3	4	-	-	ggr.	I
13	3	7	-	ggr., aktiv	ggr.	II a
16	3	14	ggr., akut, eitrig, tief	mgr., aktiv	ggr.	III
19	3	4	-	ggr., inaktiv	ggr.	II a
21	3	16	ggr., akut, eitrig, oberfl.	mgr., aktiv	ggr.	III
28	3	5	-	ggr., gemischt, destruierend	-	II a
4	4	17	-	mgr., aktiv	mgr.	II b
6	4	5	-	-	mgr.	I
9	4	15	-	hgr., aktiv, destruierend	mgr.	III
14	4	9	-	mgr., aktiv, destruierend	ggr.	II b
15	4	8	-	ggr., aktiv	ggr.	II a
17	4	14	-	ggr., gemischt	ggr.	II a
22	4	5	-	ggr., aktiv	ggr.	II a
26	4	13	-	mgr., gemischt	ggr.	II b

Legende zu Tab. 9.2: vgl. Legende zu Tab. 9.1, S. 123

9.2 Immunhistologie

9.2.1 Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen

1. Aufziehen von 3-4 μm dicken Schnitten auf Super-Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel-Gläser). 30 min Trocknen bei Raumtemperatur vor einem Ventilator, anschließend Lagerung über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C
2. Entparaffinierung und Rehydrierung
10 min Roti[®]-Histol (Carl Roth KG, Karlsruhe)
2x je 3 min Isopropanol
3 min 96% Alkohol
3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase
30 min in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5% H₂O₂ bei Raumtemperatur (Perhydrol 30% H₂O₂ p.a., 7210, E. Merck, Darmstadt)
4. Waschen in TBS

9.2.2 Besondere Verfahren

Vor dem Aufbringen der Objektträger auf die Coverplates wurde zunächst zum Nachweis von ER, PR, Ki-67 Antigen, CD 79a, COX-2 und UK eine Zitratbehandlung durchgeführt, während die Objektträger zum Nachweis von UF, CD 3, Lysozym, MAC378 mit Protease vorbehandelt wurden. Bei UG war keine Vorbehandlung nötig.

Zitrat-Behandlung

1. 10 mM Zitratpuffer pH 6,0 auf 96°C vorwärmen
2. 30 min Kochen der Schnitte in 96°C heißem Zitratpuffer
3. 30 min bei Zimmertemperatur abkühlen lassen
4. Spülen in TBS

Protease-Behandlung

1. 5 min Spülen der Schnitte in PBS bei 37°C
2. 5 min Inkubieren der Schnitte in 0,05% Protease in PBS bei 37°C (bakterielle Protease Typ XXIV, P8038, Sigma Chemie, Deisenhofen)
3. 3 x 5 min Spülen der Schnitte in eiskaltem TBS

9.2.3 Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP)

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates® (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Einbringen von je 100 µl des in 1% BSA (3895 Boehringer, Mannheim) in TBS verdünnten Primärantikörpers (bzw. des Kontrollserums) in die Coverplates®
Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate®
4. Einbringen von je 100 µl Ratte anti-Maus IgG 1:100 in 1% BSA (Bovines Serum Albumin, 3895 Boehringer, Mannheim) in TBS je Coverplate®
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
5. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate®
6. Einbringen von je 100 µl Maus-PAP 1:500 in 1% BSA in TBS je Coverplate®
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate®
und weiter mit **Abschnitt 9.2.6**

9.2.4 Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP)

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates® (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:1 Schweineserum in TBS
10 min bei Raumtemperatur
3. Einbringen von je 100 µl des in 20% Schweineserum in TBS verdünnten

Primärantikörpers in die Coverplates®

Inkubation über Nacht bei 4°C

4. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate®
5. Einbringen von je 100 µl Schwein anti-Kaninchen IgG 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate®
30 min Inkubation bei Raumtemperatur
6. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate®
7. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-PAP 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate® 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
8. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate® und weiter mit **Abschnitt 9.2.6**

9.2.5 Standard zur Nachbehandlung

1. Wechseln der Schnitte aus den Coverplates® in eine Küvette
2. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ (30%) 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) bei Raumtemperatur
3. 3 x 5 min Waschen in TBS bei Raumtemperatur
4. 5 min Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
5. 10 sec Gegenfärbung mit PAPANICOLAOUs Lösung, 5 min Bläuen in Leitungswasser
6. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe
5 min Roti®-Histol; 5 min Roti®-Histol; 10 min Xylol
7. Eindecken der Objektträger

Tab. 9.3: Als Positivkontrollen mitgeführte Gewebe des Pferdes für die immunhistologische Untersuchung

Antigen	Positivkontrolle
Östrogen- und Progesteronrezeptoren, Ki-67 Antigen, endometriale Proteine	Endometriumbiopsie (zyklisch aktive Stute)
CD 3, CD 79a	Lymphknoten
Lysozym, MAC378	Milz
COX-2	Niere

Legende zu Tab. 9.3: Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper siehe Tab. 9.4, S. 126

9.2.6 Verwendete Antikörper und Seren

Tab. 9.4: *Verwendete Primärantikörper unter Einbeziehung ihres Reaktionsmusters, ihrer Bezugsquellen und deren Verdünnung*

Primärantikörper	mab/ pab	Reaktionsmuster	Verdün- nung	Bezugsquelle
Maus anti-Human Östrogenrezeptor Clone 6F11	mab	intranukleär	1:20	NCL-ER-6F11 Medac GmbH, Wedel
Maus anti-Human Proge- steronrezeptor NCL-PGR-AB	mab	intranukleär	1:100	NCL-PGR-AB Novocastra, Wedel
Maus anti-Human Ki-67 Clone MM1	mab	intranukleär	1:10	NCL-Ki-67-MM1 Novocastra, Wedel
Kaninchen anti- Uteroglobulin	pab	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina	1:600	Dr. Klug Justus Liebig Universität, Gießen
Kaninchen anti- Uteroferrin	pab	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina	1:25	Prof. Dr. Bazer Texas A&M Univer- sity, Texas/USA
Kaninchen anti- Uterocalin	pab	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina	1:150	Prof. Dr. Allen Equine Fertility Unit, Cambridge/England
Kaninchen anti-Human CD 3	pab	Zellmembran	1:300	A 0452 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Kaninchen anti-Human Lysozym	pab	intrazytoplasmatisch	1:800	A 0099 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human CD 79 a	mab	intrazytoplasmatisch	1:15	M 7051 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human MAC387	mab	Zytoplasmasaum	1:1000	M 0747 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Kaninchen anti-COX-2	pab	intrazytoplasmatisch	1:600	160106 Caymann Chemical Co., USA

Legende zu Tab. 9.4: mab: monoklonale Antikörper; pab: polyklonale Antikörper

Schweineserum

Das von Schlachtschweinen stammende Serum wurde sterilfiltriert, zur Konservierung mit 0,05% Merthiolat versetzt und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

Sekundäre Antikörper

Als Sekundärantikörper für **monoklonale** Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 1% BSA in TBS verdünntes Ratte anti-Maus IgG (H&L, Code-Nr.: 415005100, Dianova GmbH, Hamburg) eingesetzt.

Als Sekundärantikörper für **polyklonale** Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünntes Schwein anti-Kaninchen IgG (DAKO ZO196) verwendet.

Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Komplex

Als PAP-Komplex für die **monoklonalen** Primärantikörper diente eine 1:500 in 1% BSA in TBS verdünnte Maus-PAP (Code Nr. 223005025, Dianova Diagnostika GmbH, Hamburg).

Als PAP-Komplex für die **polyklonalen** Primärantikörper wurde eine 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünnte Kaninchen-PAP (DAKO ZO113) eingesetzt.

Kontrollseren

Als Kontrollserum (Negativkontrolle) für die **monoklonalen** Antikörper aus der Maus wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenantigen von Hühner Bursa-Lymphozyten (T1; HIRSCHBERGER 1987) verwendet.

Als Negativkontrolle für die **polyklonalen** Antikörper aus dem Kaninchen wurden die Schnitte jeweils parallel mit normalem Kaninchenserum (DAKO X0902) inkubiert.

9.2.7 Lösungen und PufferTris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung:

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, 48552)

610 ml Aqua dest.

390 ml HCl 1 N (Merck, 109970)

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8% NaCl (Merck, 106400) in Aqua dest.

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2, 300 mOsm)

Stammlösung:

42 g NaCl krist. (Merck, 106400)

9,26 g Na₂HPO₄ x 2H₂O p.a. (Merck, 106580)

2,15 g K₂HPO₄ (Merck, 105104)

Aqua bidest. ad 100 ml

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in Aqua bidest.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (Merck, 100247)

(21,01 g C₆H₈O₇ x H₂O in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat (Merck, 106448)

(29,41 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml Aqua dest.)

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (Merck, 104716)

Aqua dest. ad 1000 ml

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCl

Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

100 mg DAB (Fluka 32750) in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer)

Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 μl H_2O_2 (30%) (Merck, 107210) zugeben

PAPANICOLAOUs Lösung

PAPANICOLAOUs Lösung (Merck, 109254) und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

Merthiolat Gebrauchslösung

10 g Ethylenmercurithiosalicylsäure Na-Salz (Merthiolat) (Sigma, T 5125)

100 ml 0,8% NaCl (Merck, 106400)

10 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herr Prof. Dr. H.-A. Schoon und Frau Prof. Dr. T. Katila für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Betreuung und fachliche Unterstützung dieser Arbeit danken.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Dr. Kristin Müller für ihre kompetente wissenschaftliche und freundliche persönliche Unterstützung während dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. T. Katila und Frau Dr. M. M. Rivera del Alamo sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Nutztiere der Veterinärmedizinischen Fakultät Helsinki sowie Herr Prof. H. Sieme und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Entnahme der Uterusbioptate sowie die klinisch-gynäkologische Untersuchung der beprobten Stuten.

Besonders bedanke ich mich bei Denny Böttcher, der meine stets anfallenden Fragen mit viel Geduld und Mühe beantwortet hat.

Einen großen Dank möchte ich an Frau M. Wipplinger für die Unterstützung bei der Anfertigung der Immunhistologie sowie Frau P. Schleinitz, Frau C. Pleitz und Frau B. Uhlemann für die Erstellung der histologischen Schnitte aussprechen.

Zudem möchte ich Ralf-Peter Dobroschke und Lars Riesche danken, die mir in meinen Sektionsdiensten stets zur Seite standen und die Zeit in der Halle sowohl lehrreich als auch lustig gestaltet haben. Vielen Dank für diese Zusammenarbeit.

Gesine Kubaile-Jahn und Daniela Schilling danke ich für die Unterstützung bei organisatorischen Angelegenheiten im alltäglichen Institutsleben.

Ein riesiges Dankeschön richte ich an das Team des Institutes für Veterinär-Pathologie (Denny, Jan, Kathrin, Kirsten, Kristin K., Kristin M., Liv, Lisa, Nicole, Richard, Sabine, Sandra, Sarah, Tobias)! Ich habe mich stets in Gesellschaft von Freunden befunden mit einem offenem Ohr, Witz und fachlicher Unterstützung.

Auch möchte ich meiner Studentenreitgruppe danken, durch den Zusammenhalt und die Freundschaft in dieser Gruppe ist die Zeit in Leipzig etwas ganz Besonderes geworden, denn im Osten geht die Sonne auf. Vor allem möchte ich Theresa für ihr Besuche in der Mittagspause danke, die mich während des Schreibens meiner Doktorarbeit immer wieder aufgemun-

tert haben, Lisa für ihre Unterstützung und Freundschaft in jeder Lebenslage sowie Stine für ihren Beistand und ihre Aufmunterung in schweren Zeiten.

Hendrik danke ich für die Partnerschaft und Liebe, die uns zwei verbindet und mein Leben um so viel bereichert.

Meiner Schwester möchte ich für unsere Telefonate bedanken. Es ist schön, dass es dich gibt Schwesterherz.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, sie unterstützen mich mit Liebe, Rückhalt und Lebenserfahrung und ermöglichen mir ein aufregendes, glückliches und erfülltes Leben – ich bin unendlich dankbar, solch tolle Eltern zu haben!